



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Francisco Almeida Braga Speranza

Pesquisa de anticorpos antitoxina diftérica e fenotipagem de linfócitos T em indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV-1 acompanhados no Instituto de Biologia do Exército – Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Francisco Almeida Braga Speranza

Pesquisa de anticorpos antitoxina diftérica e fenotipagem de linfócitos T em indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV-1 acompanhados no Instituto de Biologia do Exército – Rio de Janeiro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Lucimar Gonçalves Milagres

Coorientadora: Prof.^a Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S749 Speranza, Francisco Almeida Braga.

Pesquisa de anticorpos antitoxina diftérica e fenotipagem de linfócitos T em indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV-1 acompanhados no Instituto de Biologia do Exército – Rio de Janeiro / Francisco Almeida Braga Speranza. - 2009.

xiii, 54f. : il.

Orientadora: Lucimar Gonçalves Milagres.

Coorientadora: Ana Luíza de Mattos Guaraldi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Bibliografia: f. 68-78.

1. Difteria - Teses. 2. Anticorpos - Teses. 3. Imunoglobulina G - Teses. 4. Antitoxina diftérica - Teses. 5. Difteria - Vacina - Teses. 6. Doadores de sangue - Teses. 7. HIV-1 - Teses. 8. Aids (Doença) - Pacientes - Teses. I. Milagres, Lucimar Gonçalves. II. Guaraldi, Ana Luíza de Mattos de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.931

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Francisco Almeida Braga Speranza

Pesquisa de anticorpos antitoxina diftérica e fenotipagem de linfócitos T em indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV-1 acompanhados no Instituto de Biologia do Exército – Rio de Janeiro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Lucimar Gonçalves Milagres

Coorientadora: Prof.^a Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Aprovado em 21 de setembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Lílian de Oliveira Moreira
Faculdade de ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Prescilla Emy Nagao
Faculdade de ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Davis Fernandes Ferreira
Faculdade de Medicina – UFRJ

Rio de Janeiro

2009

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação à minha família. Minha esposa Maria Fátima e aos meus filhos Gabriel Francisco e Bernardo Francisco que me apoiaram e incentivaram durante estes anos de estudo e souberam compreender as minhas horas de dedicação.

Em especial aos meus pais Salvador e Maria Tereza (*in memoriam*) que sempre foram e serão exemplos de pessoas que souberam superar as dificuldades e se dedicaram à família e aos estudos, mesmo após terem tido os filhos, e também à minha irmã Bianca, que assim como eu, continua em busca do desafio de sempre querer aprender mais.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Lucimar Gonçalves Milagres, pesquisadora da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, pela orientação dada a este trabalho, sempre com muita competência e seriedade.

À Prof.^a Dra. Ana Luíza Mattos Guaraldi, pesquisadora coordenadora do grupo de pesquisa do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Médica da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, pela orientação e por ter sido a principal incentivadora do meu retorno à vida acadêmica e ingresso no mestrado.

Ao Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior, pesquisador da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ, pela ajuda dada a este estudo.

Aos colegas da equipe de trabalho do Laboratório de Virologia do Instituto de Biologia do Exército, pela colaboração no estudo, amizade e incentivo constante.

Aos colegas da equipe de trabalho do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Médica da UERJ.

Aos Diretores do Instituto de Biologia do Exército, pelo apoio durante os anos de realização deste estudo.

À equipe do Banco de Sangue do Instituto de Biologia do Exército.

À equipe do Ambulatório de Doenças Infecto Parasitárias do Hospital Central do Exército.

Aos voluntários participantes deste trabalho, pela colaboração e boa vontade, pois sem eles não seria possível a realização do estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PGCM), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob a atual coordenação do Prof. Dr. Mário Fritz Toros Neves.

À Direção e a Unidade de Laboratório do Departamento de DST e AIDS do Ministério da Saúde

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ, SR2-UERJ e IBEx pelo apoio financeiro.

... Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe,
Eu só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei...

... Sinto que seguir a vida
Seja simplesmente
Conhecer a marcha
E ir tocando em frente...

Almir Sater e Renato Teixeira

RESUMO

SPERANZA, Francisco Almeida Braga. *Pesquisa de anticorpos antitoxina diftérica e fenotipagem de linfócitos T em indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV-1 acompanhados no Instituto de Biologia do Exército – Rio de Janeiro, Brasil. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.*

Dados sorológicos sobre doenças imunopreveníveis são úteis para avaliar o sucesso de programas de imunização e a identificação de populações suscetíveis. Nos últimos 20 anos, as campanhas de imunização na infância foram eficientes no controle da difteria em muitos países. No entanto, uma taxa importante da população adulta continua suscetível à doença, uma vez que os níveis de anticorpos protetores reduzem com o passar do tempo. A infecção pelo HIV-1 leva a uma perda progressiva das funções imunes. Com o aumento da expectativa de vida dos pacientes HIV-1, e a maior incidência de infecções, torna-se importante a avaliação dos níveis de anticorpos antitoxina diftérica nestes grupos. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e a contagem de linfócitos T (LT) em indivíduos infectados ou não pelo HIV -1, assistidos no Instituto de Biologia do Exército (IBEx). Investigamos a correlação entre níveis de anticorpos específicos e os seguintes parâmetros dos grupos de estudo: sexo, faixa etária, categoria militar ou civil; vacinação prévia contra difteria; número de LT CD4+ e CD8+; e entre os indivíduos HIV-1 positivos a correlação com a carga viral e a terapia com antirretrovirais potentes (HAART). Para a quantificação de anticorpos antitoxina diftérica utilizou-se um kit ELISA (IBL Immunobiological Laboratories, Hamburg, Alemanha) e amostras de sangue de 180 indivíduos, sendo que 75 eram doadores de sangue e 105 eram pacientes positivos para o HIV-1. Aproximadamente 60% dos indivíduos estavam parcialmente protegidos contra a difteria (IgG específica $\geq 0,1 < 1,0$ UI/mL). Entre os doadores de sangue, 56% dos indivíduos estavam protegidos (IgG específica $\geq 1,0$ UI/mL) contra a doença, contra apenas 29 % dos indivíduos positivos para HIV-1. Em relação aos doadores de sangue de origem civil não se observou correlação entre os níveis de IgG e a idade, enquanto que, para os militares observou-se uma correlação inversa. Não houve diferença significativa na resposta de anticorpos para difteria entre os indivíduos soropositivos com CD4+ baixo ou normal. Pacientes com HAART mostraram uma resposta significativamente mais baixa de anticorpos (média geométrica de 0.39 IU/mL, n = 84) do que os pacientes não tratados (média geométrica de 0.58 IU/mL, n = 19). A diferença na idade média dos pacientes não tratados (46 anos) e tratados com HAART (35 anos) provavelmente influenciou estes resultados, já que os níveis de anticorpos contra a difteria declinam com o tempo. A existência em nossa comunidade de adultos (militares e civis) suscetíveis à difteria, incluindo os indivíduos soropositivos, reforça que a imunização a cada 10 anos e os estudos soroepidemiológicos são muito importantes e devem ser estimulados.

Palavras-chave: Difteria. Anticorpos protetores. IgG antitoxina diftérica. Vacinas contra difteria. Militares. Doadores de sangue. Pacientes infectados pelo HIV-1.

ABSTRACT

Serologic data on diseases that are preventable by vaccine are useful to evaluate the success of immunization programs and to identify susceptible subgroups. In the last 20 years the childhood immunization program has been efficient in the control of the diphtheria in many countries. However, an important rate of adult population remains susceptible to the illness, since diphtheria protective antibodies decline with time. HIV-1 infection leads to a progressive loss of immune functions. With the increase of life expectancy of HIV-1 patients, and also the increment of infections, it is important to know the antibody levels to diphtheria toxin in these population. The aim of this study was to evaluate the IgG levels to diphtheria toxin and T lymphocytes (LT) counts in HIV-1 infected and non- infected individuals assisted at the Instituto de Biologia do Exército (IBEx), Rio de Janeiro. We investigated the correlation between specific antibody levels and the following parameters of the study groups: gender, age-group, military or civilian origin, previous diphtheria immunization, CD4+ and CD8+ counts. For HIV-1 patients, we also analysed the correlation of specific antibodies with viral load and the use of highly active antiretroviral therapy – HAART. A commercial diphtheria-ELISA kit (IBL Immuno-Biological Laboratories, Hamburg, Alemanha) was used to evaluate IgG levels in serum samples of 180 individuals. Blood donors accounted for 75 individuals and 105 subjects were HIV-1 patients. About 60% of individuals were partially protected against diphtheria (specific IgG levels $\geq 0,1 < 1,0$ IU/mL). About 56% of blood donors were protected against diphtheria (specific IgG ≥ 1.0 IU/mL). However, only 29% of HIV-1 patients showed the same level of protective antibodies. For the civilian blood donors, there were no correlation between specific antibody levels and age group. In contrast, a negative correlation was observed in the military group. There were no differences in diphtheria serology according to CD4+ counts of HIV-1 patients or blood donors. Interesting, HAART- treated (n = 84) patients showed a significantly lower antibody response (geomean of 0.39 IU/mL) than untreated patients (geomean of 0.58 IU/mL, n = 19). As tetanus and diphtheria antibodies tend to decrease with time, the difference in age between HAART-treated patients (mean of 46 years) and those not being treated (mean of 35 years) might introduce a bias in the study. Concluding, the existence of susceptible military and civilian adults in our community, including HIV-1 patients, reinforce that reliable seroepidemiological data and immunization campaigns should be routinely stimulated.

Keywords: Diphtheria Protective Antibodies. Vaccine. Militaries. Blood donors. HIV-1 infected patients.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos indivíduos adultos soronegativos e soropositivos para HIV-1 atendidos no IBEx – RJ.....	35
Tabela 2 - Níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica e de linfócitos T CD4 e CD8 dos indivíduos atendidos no IBEx – RJ.....	40
Tabela 3 - Níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos soronegativos e soropositivos para HIV-1, estratificados por sexo.....	41
Tabela 4 - Níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos soronegativos e soropositivos para HIV-1 estratificados por faixas etárias.....	43
Tabela 5 - Percentual dos níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos doadores de sangue - civis ($n = 39$) e militares ($n = 36$) - estratificados em duas faixas etárias.....	44
Tabela 6 - Percentual dos níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos doadores de sangue - civis ($n = 39$) e militares ($n = 36$) estratificados por faixas etárias.....	45
Tabela 7 - Média geométrica (I C 95%; n) dos níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em amostras de doadores de sangue (soronegativos).....	47
Tabela 8 - Percentual de indivíduos protegidos ($IgG \geq 1$ UI/mL) ou parcialmente protegidos ($IgG \geq 0,1 < 1$ UI/mL) que receberam reforço vacinal para difteria em idade adulta.....	49
Tabela 9 - Percentual de indivíduos protegidos ($IgG \geq 1$ UI/mL) ou parcialmente protegidos ($IgG \geq 0,1 < 1$ UI/mL) que receberam reforço vacinal para difteria em idade adulta distribuídos por categoria (civil e militar).....	50
Tabela 10 - Percentual dos níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos soropositivos para HIV-1 estratificados por faixas etárias.....	51
Tabela 11 - Média (I C 95%) para a contagem de linfócitos T (células/ μ l) em indivíduos soropositivos para HIV-1 distribuídos por faixa etária.....	55

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Evolução da infecção pelo HIV/AIDS.....27
- FIGURA 2 – Correlação entre níveis de anticorpos contra difteria e a idade dos indivíduos soronegativos para HIV-1: A) militares e B) civis.....48
- FIGURA 3 – Média geométrica (IC 95%) da concentração de IgG antitoxina diftérica em militares e civis soropositivos para HIV-1 distribuídos por faixas etárias.....53
- FIGURA 4 – Média geométrica (IC 95%) da concentração de IgG antitoxina diftérica em militares e civis soropositivos para HIV-1 classificados por número de LT CD4+, com seus respectivos percentuais de anticorpos protetores.....54
- FIGURA 5 – Demonstração da distribuição dos fenótipos dos LT, a relação CD4+:CD8+ e a concentração de IgG antitoxina diftérica em indivíduos soronegativos para HIV-1 de acordo com o gênero. A) Masculino ($n= 67$), B) Feminino ($n= 38$). Com as barras do gráfico representando os 25 e 75 percentis a linha da média e os valores máximos e mínimos.....56
- FIGURA 6 – Distribuição da média das subpopulações de LT; relação CD4+:CD8+ e Carga viral. A) Indivíduos soropositivos para o HIV-1, fazendo uso do HAART ($n = 84$). B) Indivíduos soropositivos para o HIV-1, sem uso do HAART ($n = 19$). C) Média geométrica (IC 95%) da concentração de IgG antitoxina diftérica em militares e civis soropositivos para HIV-1 comparados com os indivíduos em uso de HAART ou não.....58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	- Soro albumina bovina
CD	- Marcadores de superfície celular determinados por anticorpos monoclonais (<i>Cluster of differentiation</i>)
DPT	- Vacina tríplice – associação de toxóide diftérico, <i>Bordetella pertussis</i> inativada e toxóide tetânico
dT	- Vacina dupla tipo adulto- associação de toxóide diftérico (em menor concentração) e toxóide tetânico
DT	- Vacina dupla tipo infantil – associação de toxóide diftérico e toxóide tetânico
ELISA	- Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
HAART	- Terapia antirretroviral potente (<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HIV-1	- Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (<i>Human Immunodeficiency Virus type 1</i>)
IBEx	- Instituto de Biologia do Exército
LT	- Linfócitos T
MS	- Ministério da Saúde
PBS	- Solução salina tamponada fosfatada
UI	- Unidades Internacionais
UNICEF	- Fundo das Nações Unidas para crianças (<i>United Nations Children's Fund</i>)
WHO	- Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA DIFTERIA	14
2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	16
3	ASPECTOS RELATIVOS À VACINAÇÃO CONTRA DIFTERIA E A IMUNIDADE DE POPULAÇÕES	20
3.1	Soroepidemiologia	23
3.2	Resposta imune em indivíduos imunodeficientes	26
3.3	Estudos de soroprevalência de anticorpos antitoxina diftérica em militares	30
4	OBJETIVOS	33
4.1	Objetivo geral	33
4.2	Objetivos específicos	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1	População de estudo, considerações éticas, origem e coleta das amostras de sangue	34
5.2	Métodos de coleta	36
5.3	Ensaio de contagem de linfócitos T CD3+ / CD4+/CD8+	36
5.4	Quantificação do RNA HIV- 1 – Carga Viral	36
5.5	Ensaio imunoenzimático ELISA para a detecção de anticorpos antitoxina diftérica (IgG)	37
5.6	Análise estatística	38
6	RESULTADOS	39
6.1	Níveis de anticorpos antitoxina diftérica	39
6.2	Correlação entre os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e o sexo	39
6.3	Correlação entre os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e as faixas etárias	42
6.4	Correlação entre os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e a categoria (civil e militar)	42
6.5	Correlação entre os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e a contagem de LT CD4+	52
6.6	Correlação entre os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e a terapia com antirretrovirais potentes (HAART)	57

7	DISCUSSÃO	59
8	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	83
	APÊNDICE B - Fichas de dados clínicos e laboratoriais.....	85
	ANEXO A - Calendários de vacinação (Portaria N° 1.602/GM - 17 Jul 2006).....	79
	ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	82

INTRODUÇÃO

A eficácia da imunoprevenção de doenças toxêmicas em adultos tais como a difteria e o tétano vêm sendo investigada em diversos países (Ballereau *et al.* 1998; Hadfield *et al.*, 2000). Uma vez que o aumento da sobrevivência dos pacientes imunocomprometidos incluindo portadores de HIV-1, de neoplasias, transplantados, recém-nascidos e idosos contribuiu para o aumento da incidência de infecções, a avaliação dos anticorpos antitoxina diftérica nestes grupos populacionais também se tornou objeto de interesse.

Em um grande número de doenças transmissíveis para as quais se dispõe de instrumentos eficazes de prevenção e controle, o Brasil tem colecionado êxitos importantes. Esse grupo de doenças encontra-se em franco declínio, com reduções drásticas de incidência ou estão em fase de erradicação (varíola, poliomielite e sarampo), e a meta da erradicação será atingida ainda nesta década para a raiva humana transmitida por animais domésticos, para a rubéola congênita e para o tétano neonatal. Entretanto, algumas doenças transmissíveis apresentam quadro de persistência, ou de redução em período ainda recente, configurando uma agenda inconclusa nessa área. Para essas doenças é necessário o fortalecimento de novas estratégias, recentemente adotadas, que propõem uma maior integração entre as áreas de prevenção e controle e a rede assistencial, já que um importante foco da ação nesse conjunto de doenças está voltado para o diagnóstico e tratamento das pessoas doentes, visando à interrupção da cadeia de transmissão (Portal da Saúde, 2009). Conforme os dados de evolução da difteria (1980-2005) do Ministério da Saúde nos demonstram que em 1980 houve o registro total de 4646 casos de difteria e 518 óbitos e em 2005 o registro de 18 casos, distribuídos pelas regiões norte (3), nordeste (9), sudeste (4) e sul (2) e de apenas quatro óbitos (Portal da Saúde, 2009).

1 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA DIFTERIA

A difteria é uma doença infecciosa, contagiosa, de comportamento epidêmico em população suscetível, causada por uma bactéria Gram positiva, aeróbica, pleomórfica, imóvel, não esporulada, o *Corynebacterium diphtheriae* (Funke *et al.*, 1997). A espécie foi subdividida em quatro subespécies: *gravis*, *intermedius*, *belfanti* e *mitis*, de acordo com a morfologia das colônias no agar telurito, com o padrão bioquímico de fermentação e seu potencial de hemólise. As amostras toxigenicas são aquelas que possuem integrados ao seu genoma, o material genético de um bacteriófago temperado portador do gen *tox* +. Embora o gene que codifica a

toxina esteja presente no genoma do bacteriófago β , a sua produção é controlada por fatores bacterianos, onde a síntese máxima de toxina ocorre em baixas concentrações de ferro (Hadfield *et al.*, 2000).

A difteria apresenta evolução aguda que compromete, primariamente, as mucosas do aparelho respiratório e pele (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1998; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001_b). Ao multiplicar-se na porta de entrada, o *C. diphtheriae* produz a toxina diftérica de natureza protéica que atua em todos os tecidos e possui um tropismo especial para o miocárdio, sistema nervoso, rins e supra-renais (Baseman *et al.*, 1970; Macambira, Formiga & Formiga, 1994; Beavis & Weymouth, 1996). Os primeiros sinais/sintomas da doença são relativamente inespecíficos, caracterizados, sobretudo por um mal-estar geral, febre relativamente baixa, dor de garganta e perda do apetite. Com a evolução da doença, observa-se a formação de pseudomembrana branco-acinzentada, principalmente nas regiões das tonsilas, oro e nasofaringe, e nos casos de maior gravidade, pode estender-se por todo o trato respiratório inferior, ocasionando quadro de insuficiência respiratória aguda por obstrução alta (Macambira, Formiga & Formiga, 1994; Salyers & Whitt, 1994; Hadfield *et al.*, 2000; Kadirova, Kartoglu & Strebel, 2000).

A toxina diftérica (TD) é um polipeptídeo de 535 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 62.000 Dalton. È subdividida em dois fragmentos, A e B, ligados por pontes de dissulfeto. O fragmento A, com 193 resíduos e peso molecular de 21.000 daltons, é enzimaticamente ativo e o fragmento B, com 342 resíduos e 40.000 daltons, embora não seja tóxico, é indispensável para a penetração do fragmento A no citoplasma da célula (Funke *et al.*, 1997; D'Silva & Lala, 2000). Uma única molécula de TD-A, introduzida diretamente no citoplasma, é suficiente para matar a célula eucariótica (Yamaizumi *et al.*, 1978).

A TD é uma toxina bacteriana extremamente potente, com uma dose letal mínima de 50-100 ng/kg de peso corporal (Pappenheimer, 1977; Mekada, Okada & Uchida, 1988; Pappenheimer, 1993). A inibição da síntese protéica parece não ser a única atividade biológica da toxina diftérica (Chang *et al.*, 1989_a). Foi demonstrado que a toxina possui atividade de clivagem internucleossomal de DNA atribuída ao fragmento A (Chang *et al.*, 1989_b; Nakamura & Wisnieski, 1990). O processo de degradação cromossomal precede a citólise e não parece ser uma simples consequência da inibição da síntese protéica. Entretanto, a proposição de uma segunda via de morte celular é ainda bastante discutida na literatura e permanece por ser definida (Groman & Dean, 1973; Bodley, 1990; Johnson, 1990; Wilson *et al.*, 1990);

Eventualmente o *C. diphtheriae* pode romper as barreiras da mucosa, alcançar a corrente sanguínea e se instalar no endocárdio, articulações e pulmões (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1998; Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001_a). O *C. diphtheriae*, entretanto, já foi isolado de sítios anatômicos incomuns tais como conjuntiva e esperma (Machado, 1989; Formiga & Mattos-Guaraldi, 1993; Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998) e, mais recentemente, de lesão neoplásica cutânea (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2001_b). O *C. diphtheriae* parece estar incluído entre as espécies associadas a quadros clínicos graves e fatais em pacientes com câncer. Sua virulência frequentemente tem sido subestimada pelos profissionais de saúde. Amostras de *C. diphtheriae* isoladas simultaneamente de dois pacientes com câncer, internados em uma mesma enfermaria do Instituto Nacional do Câncer, no Rio de Janeiro, exibiram características moleculares semelhantes quando analisados os perfis de proteínas totais e seu material genético. Os dados enfatizaram a possibilidade de o *C. diphtheriae* estar relacionado a quadros de infecção no ambiente hospitalar, particularmente entre indivíduos imunocomprometidos (Pereira, 2001).

A transmissão do *C. diphtheriae* se faz de pessoa a pessoa, através de gotículas de secreção respiratória contendo a bactéria ou através de secreção de lesões cutâneas. A pele pode ser um reservatório de potencial importância na manutenção da circulação do *C. diphtheriae*. O microrganismo pode ser isolado de vários tipos de lesões cutâneas, principalmente em zonas tropicais, onde são comuns as picadas de insetos e os traumatismos. Admite-se que as infecções cutâneas são mais contagiosas do que as do trato respiratório (Macambira, Formiga & Formiga, 1994).

2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Dentre os principais fatores predisponentes para o estabelecimento de infecções pelo *C. diphtheriae* encontram-se as condições sócio-econômicas e higiênicas inadequadas e o estado de imunocomprometimento, particularmente nos casos decorrentes de infecção pelo HIV (Patey *et al.*, 1997; Funke *et al.*, 1999). Em países industrializados, indivíduos portadores de amostras de *C. diphtheriae* atoxinogênicas foram observados em subgrupos populacionais de homossexuais, mendigos, usuários de drogas, alcoólatras e prisioneiros (Zuber *et al.*, 1992; Patey *et al.*, 1997; Funke *et al.*, 1999).

A partir dos anos 80, vários países no mundo passaram por um progresso na erradicação ou controle da difteria. A taxa de incidência de difteria atingiu níveis tão aceitáveis, e até ausentes em alguns países que foi acompanhada da esperança, por parte da comunidade

científica, de que a difteria fosse erradicada na Europa por volta do ano 2000 (Galazka, 2000). Entretanto, a doença ressurgiu como uma epidemia massiva na antiga União Soviética durante a década de 1990. Houve extensão para 15 nações independentes assim como para alguns países da Europa Ocidental (Finlândia, Alemanha, Noruega, Polônia) e a Ásia (Mongólia), indicando que a difteria permanece como uma patologia de elevada morbidade, letalidade, apresentando potencial epidêmico e pandêmico. Desde o seu início, em 1990, mais de 150.000 casos acompanhados por 4.000 óbitos foram notificados à Organização Mundial da Saúde (OMS). Os números representaram mais de 90% de todos os casos de difteria no mundo de 1990 a 1995 (Dittmann, 1997). A principal característica desta epidemia na Europa Oriental foi a alta proporção de casos entre adolescentes e adultos. Sob o ponto de vista da assistência à população doente, poucos médicos possuíam experiência em diagnóstico e tratamento de difteria. A epidemia inicialmente urbana disseminou rapidamente para as regiões rurais. Na República do Kurgistão, cuja epidemia incidiu entre 1994-1998, 70% dos pacientes hospitalizados estavam na faixa etária acima de 15 anos de idade. Em 146 casos onde se registrou no prontuário a história de vacinação, no grupo de 0 a 19 anos, 68% tinham recebido pelo menos três doses de toxóide diftérico desde o seu nascimento. Entre 161 pessoas com mais de 20 anos, com históricos conhecidos de vacinação, 52% não haviam recebido nenhuma dose desde 1990; 40%, 6% e 3% tinham recebido uma, duas e três ou mais doses, respectivamente desde 1990. A média de idade de 19 pacientes que morreram foi de 12 anos (3-53 anos); 42% dos casos fatais foram acima de 15 anos. Entre os pacientes adultos com difteria houve um predomínio do sexo feminino. A respeito das características clínicas da difteria entre os pacientes hospitalizados, quando comparadas com as séries da era pré-vacinal, foi verificado o predomínio da apresentação sem pseudomembrana, com poucos casos de envolvimento laríngeo (Kadirova, Kartoglu & Strebel, 2000).

Na República da China a imunização para difteria foi iniciada em 1973. No condado de Jiangling a aplicação do toxóide diftérico fez parte da imunização básica e de 1985 a 1987 não foram documentados novos casos. A partir de setembro de 1988 a janeiro de 1989, uma epidemia ocorreu em sete cidades e numa fazenda, acometendo, principalmente a população adulta. Dos 103 casos, a maior incidência registrada foi na faixa etária de 21 - 40 anos. A taxa de imunização com toxóide diftérico na China nas crianças de 1-2 anos foi de 53% em 1984, 63% em 1985, 70% em 1985 e 82% em 1988. A população adulta neste período não era imunizada. Os casos de difteria nos adultos na proporção do total de casos aumentaram

drasticamente de 12,5% em 1970 e 40% em 1981-1984 para 77,67% em 1988-1989 (Youwang *et al.* 1992). A provável explicação para a inversão da distribuição de casos de difteria segundo a faixa etária seria a redução de portadores e os baixos níveis de imunidade na população adulta.

Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, verificou-se que a proporção de casos de adultos com difteria aumentou consideravelmente a partir da década de 60, período pós-vacinação. Em 1960, 21% dos casos notificados neste país estavam acima de 15 anos, em 1964, já atingira 36% e no período de 1971-81, 48% dos casos de difteria não cutânea estavam na faixa etária acima de 15 anos. Dos 51 óbitos relatados em 1971-1975, 20 foram de pessoas com idade inferior a 10 anos e 17 pessoas acima de 50 anos (Dixon, 1984). Em alguns outros países desenvolvidos, foram verificados pequenos surtos epidêmicos nos adultos em comunidades de alcoólatras, drogadictos e indígenas (Bjorkholm *et al.*, 1986; Edmunds *et al.*, 2000)

Historicamente a vacinação pode ser considerada como uma das realizações mais bem sucedidas da saúde pública no século XX. Podemos destacar ainda alguns triunfos como a erradicação da varíola e o controle de algumas doenças como a poliomielite. Houve também uma redução significativa no impacto imposto pelas doenças como o sarampo, caxumba, hepatites, influenza, difteria, *Haemophilus influenzae* tipo B e muitas outras infecções (Boog, 2009).

Mesmo com a visível evolução na Saúde Pública mundial ainda existem relatos de casos de difteria nos diferentes continentes decorrentes da falta de vacinação e por ignorância dos benefícios por ela adquiridos. Em um hospital de Kolkata, realizou-se um estudo com 107 pacientes admitidos de maio de 2004 a abril de 2005 com diagnóstico de difteria, dos quais 12,1% foram casos fatais. Em entrevista, 84 pacientes foram considerados não imunizados e a maioria dos respondentes, 73 pacientes ou membros da família representante, não tinha conhecimento sobre os modos de propagação e prevenção da doença. Na entrevista, apenas um indivíduo demonstrou ter conhecimento sobre os benefícios da vacina de DTP. A razão principal (44%) para a não imunização foi a falta de informação sobre a necessidade de imunização (Anima *et al.*, 2008).

No Rio de Janeiro, algumas amostras toxinogênicas de *C. diphtheriae* subsp. *mitis*, foram isoladas de casos de endocardite em diferentes unidades nosocomiais em períodos distintos (Hirata Jr *et al.*, 2008). O primeiro caso descrito ocorreu com um adolescente que evoluiu para um quadro de endocardite mitral fatal, independente do tratamento com penicilina (Mattos-Guaraldi & Formiga, 1998). O segundo caso ocorreu em criança de 9 anos de idade, não portadora de lesão cardíaca prévia e com histórico de vacinação completa contra a difteria, culminado na implantação de próteses valvulares aórticas e mitrais. As duas amostras referidas acima apresentaram similaridade nos perfis de proteínas totais e foram agrupadas em um mesmo padrão eletroforético (Pereira, 2001).

Evidências epidemiológicas apontam que, em faixas etárias mais elevadas, a imunidade natural adquirida é mantida após contatos com portadores crônicos assintomáticos principalmente de origem cutânea ou da nasofaringe. Entretanto, a difteria também pode comprometer indivíduos adultos. (Formiga & Mattos-Guaraldi, 2001).

No Rio de Janeiro, Mattos-Guaraldi e colaboradores (2001_a) acompanharam um caso clássico de difteria ocorrido em uma mulher adulta. Estes autores relataram que a soroterapia só foi iniciada após a identificação microbiológica. Os mesmos alertam para a possibilidade da população de adolescentes e adultos estar suscetível à difteria, uma vez que, segundo o Ministério da Saúde (MS), a população infantil tem apresentado boa cobertura vacinal para a difteria nos últimos anos (Bolet Epidemiol, MS, 1999).

O número de casos de difteria no Brasil decresceu progressivamente. Em 1990, foram notificados 640 casos, número que caiu para 56 em 1999. No ano 2000, registrou-se 58 casos de difteria, e nos anos de 2004 e 2005 foram apenas 17 e 18 casos, respectivamente. Em 2006, observou-se uma diminuição ainda mais significativa, com apenas 9 casos de difteria no país. Apesar da tendência constante de queda da incidência e da mortalidade, observada em todas as faixas etárias, a letalidade apresentou um aumento nos últimos anos: de 2000 a 2004 apresentava-se em torno de 11%, com pequenas variações, e em 2005 e 2006 o índice esteve em 22%, o que pode estar relacionado à diminuição do número de casos, suspeição diagnóstica tardia, qualidade da assistência deficiente, acesso aos serviços de saúde e consequente piora do prognóstico (Portal da Saúde, 2009_a).

Diante da possibilidade de reemergência da difteria, vários países, incluindo o Brasil, mantêm a infecção na lista nacional de doenças com notificação compulsória. De acordo com a Portaria SVS/MS Nº 5 de 21 de fevereiro de 2006, todo caso de difteria é de notificação obrigatória às autoridades locais de saúde (em até 24h). Deve-se realizar a investigação epidemiológica em até 48 horas após a notificação, avaliando a necessidade de adoção de medidas de controle pertinentes. A investigação deverá ser encerrada até 60 dias após a notificação. A unidade de saúde notificadora deve utilizar a ficha de notificação/investigação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN encaminhando-a para ser processada, conforme o fluxo estabelecido pela Secretaria Municipal de Saúde (Portaria Nº5 SVS/MS, 2006).

3 ASPECTOS RELATIVOS À VACINAÇÃO CONTRA DIFTERIA E A IMUNIDADE DE POPULAÇÕES

A imunidade contra a difteria é mediada primariamente por anticorpos que neutralizam a ação da toxina, impedindo a toxicidade celular. A difteria pode acometer pessoas susceptíveis (sem anticorpos em níveis considerados protetores) de qualquer idade e não apenas as crianças, como era mais comum antes da utilização sistemática da vacina. Pessoas imunes podem ainda portar o microrganismo na nasofaringe e/ou na pele. A suscetibilidade é geral. A imunidade pode ser naturalmente adquirida pela passagem de anticorpos maternos via transplacentária nos primeiros meses de vida do bebê, ou também através de infecções inaparentes atípicas que conferem em diferentes graus, dependendo da maior ou menor exposição dos indivíduos. A imunidade também pode ser ativa, adquirida através da vacinação com toxóide diftérico. O soro antidiftérico (SAD) é utilizado em pacientes com diagnóstico de difteria e confere uma proteção temporária e de curta duração (em média duas semanas). A doença normalmente não confere imunidade permanente, devendo o doente continuar seu esquema de vacinação após alta hospitalar.

A difteria ocorre durante o ano todo, mas, como toda a infecção respiratória, espera-se um provável aumento da sua incidência nos meses frios (outono e inverno), devido principalmente à aglomeração em ambientes fechados que facilitam a transmissão do bacilo. Contudo, essa diferença não é significativa para as regiões que não apresentam grandes oscilações sazonais de temperatura ou onde a população mantém alto índice de aglomeração

durante todo o ano. Ela pode afetar todas as pessoas não imunizadas, de qualquer idade, raça ou sexo (Portal da Saúde, 2009_b).

O Programa Ampliado de Imunizações (PAI) instituído em 1974 pela OMS inclui seis doenças: poliomielite, sarampo, tétano, difteria coqueluche e tuberculose e constituiu um marco importante para a ampliação do controle de doenças por meio de vacinas. Como resultado efetivo do programa atual, tem-se uma cobertura vacinal mundial média de 81%. Na Europa e nas Américas foram alcançadas coberturas vacinais superiores à média mundial.

Baseado nas últimas estimativas globais da OMS/UNICEF para 2007(WHO/UNICEF, 2009), as tendências relacionadas à cobertura vacinal global continuam a ser positivas. Estima-se que a imunização contra difteria, tétano, coqueluche e sarampo evita atualmente mais de 2.5 milhões de mortes a cada ano em todos os grupos de idade. Cada vez mais um maior número de países consegue níveis elevados de cobertura vacinal. Três regiões das Américas, Europa e o Pacífico ocidental, estão mantidos sobre a cobertura vacinal de 90%, quando a região Mediterrânea oriental alcançou 87%. Ao compararmos o número dos países que alcançam 90% ou mais de coberturas vacinal com três doses da DTP3 (diphtheria-tetanus-pertussis) nos anos de 2006 e 2007, observamos que a cobertura DTP3 de 80% em 117 (61%) países em 2007, comparados a 113 (59%) em 2006 e a cobertura continua a aumentar com registros de 156 países em 2007 comparados a 151 em 2006.

A cobertura global das crianças em 2007 com a vacina DTP3 foi de 81% comparado a 75% em 1990. O número estimado das crianças vacinadas com a DTP3 em 2007 alcançou 105 milhões. Por outro lado, estimou-se também para 2007 que 2,4 milhões de crianças no mundo deixaram de ser imunizadas (DTP3), com destaque para sudeste da Ásia com 11,5 milhões e África com 7,3 milhões (WHO, 2009).

Com o aumento da morbidade, ressurgiu a preocupação da comunidade científica com o grau de imunização de populações submetidas a esquemas de vacinação. A redução da circulação de cepas toxigenicas de *C. diphtheriae*, devido a eficiente cobertura vacinal na infância, propiciou cada vez menos a exposição natural ao microrganismo. Ao mesmo tempo, a melhoria das condições de higiene auxiliou na diminuição da circulação de cepas responsáveis pela forma cutânea da doença, o que parece favorecer o aparecimento de grupos populacionais susceptíveis à doença (Bayas *et al.*, 2001).

A vacina deve ser feita por injeção intramuscular profunda e as reações podem ser endureção e vermelhidão no local da aplicação. Reações gerais como febre e urticária são raras. Segundo a literatura a eficácia da vacinação com o toxóide diftérico varia de 45 a 90%, embora não haja registros que demonstrem avaliação através de ensaios randomizados, duplo-cego, controlados por placebo (Schneerson *et al.*, 1996). Para diversos autores, o ressurgimento da difteria na população adulta pode ser justificado pelos baixos níveis de IgG anti-toxóide diftérico da população acometida (Schwning, 1997; Galazka, 2000).

Considerando-se que no momento a difteria no Brasil está sob controle graças à imunização com o toxóide diftérico e que, com a melhoria das condições sócio-econômicas da população, houve uma redução importante da circulação do *C. diphtheriae*, a população adulta ainda pode estar suscetível à doença, uma vez que os anticorpos protetores vão declinando com o passar do tempo. Estes anticorpos poderão ser mantidos por infecções subclínicas, contato com portadores ou, mais efetivamente, após reforços com o toxóide diftérico. Atualmente muitos países recomendam reforços vacinais em diferentes períodos de tempo após a imunização primária. Cabe ressaltar que após cada dose reforço contendo toxóide tetânico e diftérico ocorre aumento gradativo na produção de anticorpos atingindo níveis mais elevados em imunizações subsequentes, permanecendo por períodos de tempo prolongados (Galazka, 1993).

No Brasil é recomendado o reforço com a vacina dT a cada 10 anos. A Portaria Ministerial Nº 1.602 de 17 de Julho de 2006, institui em todo o território nacional, os calendários de Vacinação da Criança, do Adolescente, do Adulto e do Idoso, integrantes do Programa Nacional de Imunizações (PNI), visando controle, eliminação e a erradicação das doenças imunopreveníveis. E ainda, em seus artigos, estabelece que a atualização do Calendário de Vacinação deva atender ao disposto nessa Portaria (Anexo A), determina que as unidades de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS) devam adotar as vacinas e os períodos estabelecidos nos calendários e que o cumprimento das vacinações seja comprovado por meio de atestado de vacinação emitido pelos serviços públicos de saúde ou por médicos em exercício de atividades privadas, devidamente credenciadas para tal fim pela autoridade de saúde competente, conforme o disposto no art. 5º da Lei nº 6.529/75, o comprovante de vacinação deverão ser fornecidos pelos médicos e/ou enfermeiros responsáveis pelas unidades de saúde.

Atualmente são utilizadas várias técnicas na pesquisa de anticorpos circulantes anti-toxóide diftérico. Os testes *in vitro* mais utilizados incluem os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), testes de neutralização em culturas de células de mamíferos (célula VERO) e a hemaglutinação. Dentre estes, o teste de neutralização em células VERO é o que mais se correlaciona com os testes de neutralização *in vivo*, realizados através de injeção intradérmica em coelhos ou cobaios, de uma mistura de certa quantidade de toxina diftérica com diluições seriadas de soro do paciente. O resultado é aferido pela presença ou ausência de uma inflamação local causada pela toxina e o título de anticorpos do paciente é aquele referente a última diluição do soro injetada no animal que não permitiu a ocorrência de inflamação local (Simonsen,1989; Galazka,1993). O teste de ELISA é de fácil execução, pouco oneroso e ainda é capaz de especificar as classes de imunoglobulina presentes nas amostras. Não existe uma definição exata quanto ao nível de imunidade que garanta proteção completa. Segundo os produtores do Kit de ELISA, utilizado no presente estudo, níveis séricos de IgG antitoxina diftérica $> 1,0$ UI/mL são considerados como indicadores de imunidade contra a doença; níveis entre 0,1 e 1,0 UI/mL são indicativos da necessidade de reforço vacinal e níveis menores que 0,1 indicam que o indivíduo deve receber a vacinação básica (IBL Diphtheria IgG ELISA).

3.1 Soroepidemiologia

Desde o início da utilização dos toxóides tetânico e diftérico como antígenos vacinais, a duração da imunidade contra tais doenças após a vacinação é um aspecto muito discutido na literatura. Ficou demonstrado que ocorre uma queda nos níveis de antitoxina tanto para tétano quanto para difteria. Em estudo realizado na Espanha, acima de 95% das crianças até 9 anos tinham níveis protetores de anticorpos. Este percentual decresceu gradualmente, com a idade, chegando aos 32,3% no grupo etário dos 30-39 anos (Instituto de Saúde Carlos III, Espanha, 2000). Em outra investigação realizada na França, detectou-se que 73,5% dos indivíduos com menos de 40 anos estavam protegidos. Somente 33% dos indivíduos com mais de 65 anos estavam protegidos. Além disto, observou-se que a proporção de homens protegidos era superior à das mulheres (Ballereau *et al.*,1998).

Na Alemanha, ensaios laboratoriais realizado numa amostra de 321 doadores de sangue, utilizando ELISA, com os cortes dos níveis de proteção semelhante ao utilizado no presente estudo, foi observado uma prevalência de 32,1% de doadores com níveis de anticorpos antitoxina circulantes classificados pelos autores como parcialmente imunes (Aue *et al.*, 2003).

Na Turquia, teste laboratorial determinou a imunidade para difteria em uma população de 339 indivíduos de 20 a 81 anos. Aproximadamente 56% da população apresentaram imunidade insuficiente para difteria com títulos menores que 0,1 UI/mL. Os valores de anticorpos protetores para a difteria apresentaram uma queda gradual com a idade. O maior percentual (30,6%) de pessoas com baixa imunidade foi observado na faixa etária de 40-49 anos. Não foram observadas diferenças significativas na imunidade quando correlacionadas com o sexo, nível de escolaridade ou origem rural (Alp Carvus, Oguuz & Yuce, 2007).

Em testes sorológico em adolescentes de 7 a 16 anos da Rússia (n = 106) e Noruega (n = 117), demonstraram que as crianças entre 7 e 10 anos da Rússia apresentaram maior proteção para difteria quando comparado com as crianças da Noruega. Segundo os autores, este fato foi motivado pela aplicação do reforço vacinal no início do período escolar na Rússia, o que não aconteceu na Noruega. Porém, em ambos os países ocorre reforço vacinal entre 11 e 12 anos, e ao comparar os níveis de anticorpos anti-toxóide diftérico e tetânico em idades superiores (13-14 anos e 15-16 anos), as diferenças não foram significativas (Danilova *et al.*, 2006)

Em um estudo soroepidemiológico na Áustria, com 558 pacientes (205 mulheres e 353 homens, idade de 18 a 70) foram medidas as concentrações de anticorpos antitoxina diftérica utilizando os Ensaio de ELISA e de Neutralização da toxina em cultura de células, onde 27,1% dos pacientes eram suscetíveis a difteria, 26,5% possuíam proteção básica e 46,4% foram considerados totalmente protegidos. A concentração mediana da antitoxina diftérica encontrada foi de 0,08 IU/ml (0,0 – 0,29; quartis Q25-Q75). Foi observada a tendência não linear para diminuição da imunidade conforme o aumento da idade ($P < 0,001$) e as mulheres estavam menos protegidas que os homens ($p = 0,006$). A imunização no País de origem não teve influência na imunidade ($p=0,49$). A análise de regressão linear múltipla mostrou que a idade ($p<0,001$) e o gênero ($p=0,004$) apresentam influência independente e significativa no nível da imunidade para difteria, no entanto o País de origem da imunização não foi significativo ($p=0,72$) (Marlovits *et al.*, 2000).

Ensaio sorológico realizado em 18.045 pessoas examinadas entre 1988 a 1994, maiores que 6 anos de idade, selecionadas de 89 localidades dos Estados Unidos, sob a forma randômica demonstrou que 60,5% dos americanos > 6 anos apresentaram níveis de anticorpos protetores satisfatórios para difteria, 72,3% proteção total para tétano e somente 63% dos adultos apresentaram anticorpos protetores para difteria e tétano. Além disso, na faixa etária superior 20

anos de idade, apenas 47 % apresentaram níveis de anticorpos protetores para ambas as doenças (McQuillan *et al.*, 2002)

No município de São Paulo, a avaliação dos anticorpos anti-toxóide diftérico nos soros de 130 crianças saudáveis revelou que 31%, 14%, 5% de indivíduos susceptíveis nas idades de 7, 8 e 9 anos, respectivamente. Todas as crianças de 10 anos de idade apresentaram níveis de anticorpos protetores contra a difteria (Lizuka, Furuta & Oliveira, 1980).

Outro estudo realizado em São Paulo avaliou 208 adolescentes com idade de 10 a 20 anos, através da detecção de anticorpos, utilizando ELISA duplo antígeno (toxóide diftérico marcado ou não com biotina). Todos os adolescentes haviam completado o esquema vacinal básico e a maioria (77%) tinha recebido a dose reforço a cada 10 anos. A análise de IgG específica revelou que 86% dos indivíduos estavam protegidos contra a difteria (níveis de anticorpos $\geq 0,1$ UI/mL). Aproximadamente 13% precisavam de uma dose reforço e somente 1 precisava receber a vacinação básica novamente. Entretanto, os autores enfatizaram a necessidade do reforço vacinal, para evitar a queda dos níveis de anticorpos protetores para essas doenças (Dinelli, Fiesberg, & Moraes Pinto, 2007).

No Rio de Janeiro um estudo soroepidemiológico com 234 soros de doadores de sangue com idade de 18 a 61 anos demonstrou que somente 30,7% dos indivíduos estavam totalmente protegidos contra a difteria, ou seja, apresentaram IgG antitoxina diftérica $\geq 1,0$ UI/mL através do método de ELISA, sugerimos que a imunidade para difteria entre adultos brasileiros saudáveis é insuficiente, segundo os critérios da OMS. Dentre as amostras estudadas, 140 também foram testadas pelo método de neutralização de anticorpos específicos para antitoxina diftérica em cultura de células Vero. A validação dos valores de ELISA revelou alta especificidade e um bom valor preditivo para avaliação de proteção total. O ELISA mostrou 96% (98/102) de especificidade, 55,3% (21/38) de sensibilidade, 84% [21/25, 95% intervalo de confiança (IC) 78-90] e 85% (98/115, 95% IC 79-91) nos valores preditivos positivos e negativos respectivamente, com correlação entre níveis de anticorpos entre o ensaio de neutralização ($\geq 0,1$ UI/ml) e ELISA (títulos ≥ 1 UI/ml) correspondente ao $k=0,575 \pm 0,081$ ($P < 0,001$) (Damasco *et al.*, 2005).

3.2. Resposta imune em indivíduos imunodeficientes

As imunodeficiências correspondem a uma grande variedade de desordens que tornam os indivíduos mais suscetíveis às doenças infecciosas. São classificadas em imunodeficiências primárias (as causas constituem aproximadamente 80 defeitos genéticos) ou secundárias (após processos infecciosos, uso de medicamentos imunossupressores ou quimioterapia contra o câncer). Inicialmente consideradas de pouca relevância em termos de incidência, a partir da emergência do vírus da imunodeficiência humana – HIV-1 os estados de imunodeficiência são motivos de preocupação em saúde pública, em face da severidade com que as doenças infecciosas atingem os indivíduos (Cooper, Pommering, Korányi, 2003). O vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), um retrovírus da família Lentivírus, caracteriza-se pela replicação em células do sistema imunológico (preferencialmente os linfócitos T CD4+) e geralmente promove uma infecção de evolução que se pode dividir em três fases: fase aguda, fase de latência clínica e fase sintomática que por esgotamento da resposta imune favorecendo o surgimento de infecções oportunistas, doenças malignas e degeneração do sistema nervoso central. Tais efeitos constituem a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS (**Figura 1**).

No Brasil, o primeiro caso da doença foi reconhecido em 1980. Segundo os Sistemas de Informação do Ministério da Saúde foram notificados 506.499 casos até 30 de junho de 2008, 305.725 no Sudeste, 95.552 no Sul, 58.348 no Nordeste, 28.719 no Centro Oeste e 18.155 no Norte. Aproximadamente 206 mil mortes foram relacionadas à infecção pelo HIV-1 até 2007 (Boletim Epidemiológico AIDS/DST, 2008). Entre 1980 e 2007 observou-se que, do total de casos identificados em homens, 78% ocorreram em indivíduos na faixa etária de 25 a 49 anos. Para as mulheres, essa proporção correspondeu a 71%. Em ambos os sexos, foram observados um aumento percentual de casos de AIDS na faixa etária de mais de 50 anos. Em 2007, o Brasil apresentou taxa de incidência (por 100 mil habitantes) de casos notificados de

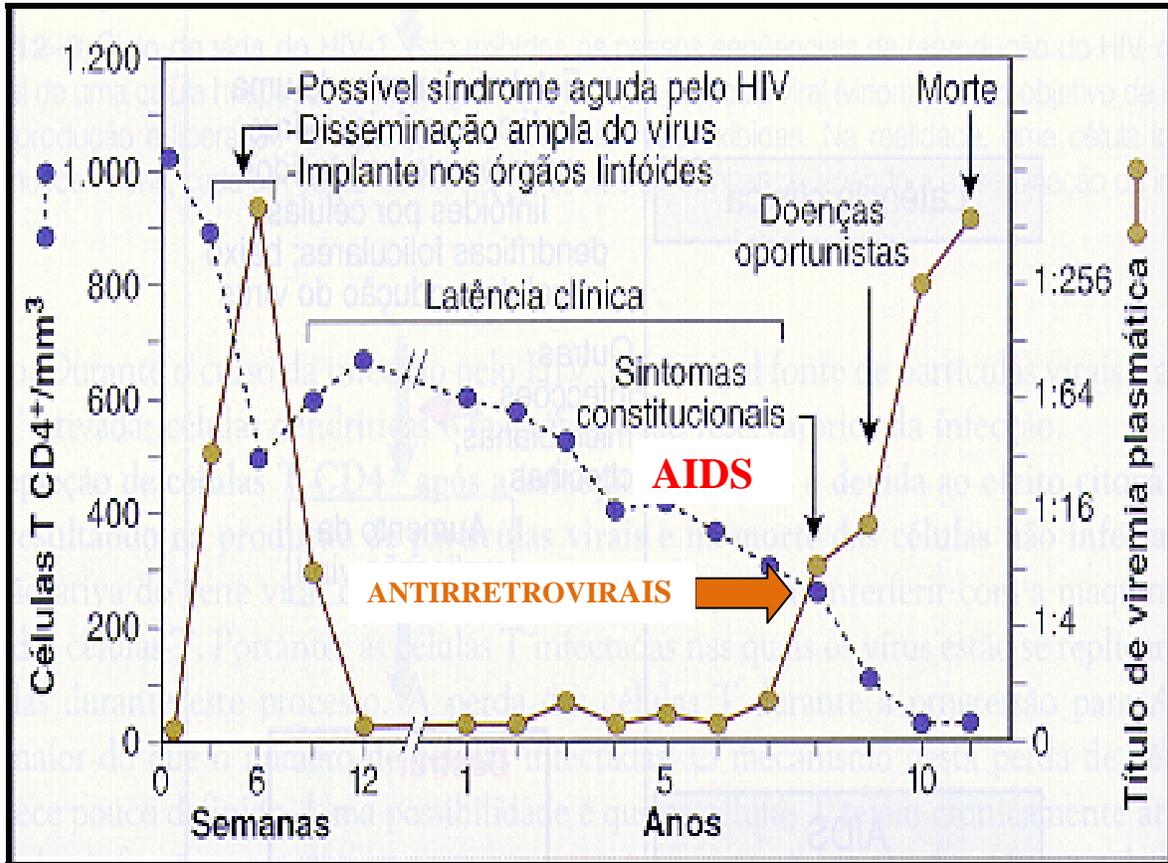


FIGURA 1 – Evolução da infecção pelo HIV/AIDS (Abbas AK. Imunologia Básica, 2007)

17,8, com destaque para região sul que apresentou a maior taxa de casos notificados (por 100 mil habitantes) de 29,4 (Boletim Epidemiológico AIDS/DST, 2007).

O Grupo de trabalho de vigilância global HIV/AIDS e Doenças sexualmente transmissíveis da UNAIDS e OMS estimaram que em 2007 o Brasil apresentasse os seguintes dados: 730 mil pessoas vivendo com HIV; a prevalência em sua população de pessoas infectada com HIV seria $\leq 1,0\%$ na faixa etária 15 a 49 anos; incluídos nesta estimativa adultos (+ 15 anos) e crianças, também foram incluídas pessoas que não desenvolveram sintomas para AIDS. Este mesmo grupo de trabalho estimou também que 181 000 pessoas receberam tratamento com antirretrovirais em 2007, sendo que baseado na metodologia de cálculo empregada pelo grupo, 230.000 pessoas necessitariam ainda, de receber a terapia com antirretrovirais neste mesmo ano, concluindo assim, que a terapia com antirretrovirais atende 80% dos necessitados (UNAIDS/WHO, 2008)

O tratamento do paciente portador do HIV-1 com a utilização de drogas que interferem com a evolução do processo infeccioso, especialmente com a associação de fármacos que inibem a síntese de partículas virais, tem aumentado a expectativa de vida do paciente. Estes pacientes apresentam uma reconstituição da imunidade em níveis variáveis, incluindo a resposta imunológica a antígenos vacinais. Diversos trabalhos mostraram que pacientes infectados pelo HIV-1 recebendo a terapia antirretroviral, apresentam melhor resposta às imunizações do que aqueles que não estão em tratamento (Kroon *et al.*, 1995; Valdez *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2003).

Atualmente são conhecidas algumas particularidades em relação à imunização de indivíduos infectados pelo HIV-1. Em geral, estes pacientes não devem receber vacinas contendo agentes atenuados, especialmente aqueles que apresentam imunodeficiência avançada, visto que existe o risco de desenvolvimento da doença a partir do agente vacinal. Entretanto, recomenda-se que crianças e adultos com infecção assintomática pelo HIV-1 recebam todas as vacinas previstas no calendário vacinal. Para os indivíduos com infecção sintomática são contraindicadas as vacinas BCG, febre amarela, sarampo e rubéola constituída de agentes ativos (atenuados); deve-se substituir a vacina anti-pólio oral pela anti-pólio inativada (Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos/MS, 2008)

No caso de gestantes infectadas pelo HIV-1 a indicação de imunização com a vacina dT é similar àquelas gestantes saudáveis e não infectadas pelo HIV-1, de modo a prevenir o tétano neonatal nesta população. Estudos recentes mostraram que mulheres infectadas pelo HIV-1 apresentaram níveis de anticorpos antitetânicos e antidiftéricos mais baixos do que as mulheres não infectadas. Após o reforço com a vacina dT, ambos os grupos responderam a imunização embora os níveis de anticorpos antitetânicos e antidiftéricos tenham sido mais elevados no grupo controle (Bonetti *et al.*, 2004)

A resposta ao reforço vacinal em adultos infectados pelo HIV-1 parece não ser tão prejudicada, pois nestes casos os adultos provavelmente já receberam a imunização primária na infância quando ainda não haviam adquirido o vírus. Sendo assim, possuem memória imunológica, e ao receberem o reforço vacinal, estas células proliferariam resultando em produção de anticorpos. A resposta à imunização em crianças infectadas pelo HIV-1 pode estar prejudicada, visto que a infecção leva a uma disfunção tanto de células T, quanto de células B anterior ao recebimento da vacina (Borkowsky *et al.*, 1987). Entretanto, um estudo avaliando a resposta à vacinação em crianças infectadas pelo HIV-1, demonstrou que os indivíduos infectados apresentaram uma resposta humoral aos toxóides tetânico e diftérico após o esquema com três doses e o primeiro reforço inferior à resposta de crianças saudáveis apenas quando pertenciam a categorias imunológicas e clínicas mais comprometidas, ou seja, categorias 2/3 e B/C, respectivamente (Pracanica *et al.*, 2002). Os níveis de anticorpos induzidos pela imunização em indivíduos HIV-1 positivos tendem a cair mais rapidamente do que em pessoas não infectadas.

Outro ponto discutido é a ocorrência do aumento da carga viral após a administração de vacinas em pacientes soropositivos para o HIV-1. Acredita-se que o aumento da carga viral é transitório e não traz prejuízos ao paciente, e não contra-indica a utilização de vacinas (Stanley *et al.*, 1996). Dois estudos recentes evidenciaram que indivíduos infectados com HIV apresentaram níveis de anticorpos antitoxina diftérica em menor quantidade comparada com outros indivíduos não infectados. No primeiro estudo, um *cohort* transversal em pacientes adultos da Clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo, para avaliação da cobertura vacinal em pacientes infectados com HIV, foi visto que apenas 36,1% dos pacientes estavam adequadamente imunizados para Difteria/Tétano, 54,9% para pneumococos, 24,3% para gripe e 76,9% para Hepatite B, resultados baixos comparados com pacientes não infectados. Sugerindo os autores que

campanhas de vacinação deveriam ser introduzidas à rotina das clínicas de tratamento de pacientes com doenças sexualmente transmissíveis e AIDS (Ho *et al.*, 2008). No segundo estudo, também *cohort* transversal visando avaliar a resposta vacinal praticada na rotina clínica, foi usada a vacina tríplice bacteriana de células íntegras (DTPw) - composta de toxóide diftérico (D), toxóide tetânico (T) e células inteiras de *Bordetella pertussis* (Pw) - em crianças com idade de 18 a 36 meses, nascidas de mães infectadas com HIV e moradoras da República dos Camarões, África Central. Foram analisadas amostras de sangue para dosagens de anticorpos para Pw, difteria e tétano de 50 crianças HIV infectadas e 78 crianças HIV expostas, mas não infectadas. Os níveis de aglutinação foram significativamente mais baixos nos HIV infectados do que nos HIV expostos, mas não infectados (30% e 55,1%, $p= 0,005$). Foi observada também, que crianças HIV infectadas com severa imunodeficiência ($CD4+ < 25\%$) obtiveram níveis mais baixos de anticorpos gerados pela vacina DTPw. Este estudo ainda sugeriu a necessidade de dose de reforço da vacina DTPw, para manter níveis de anticorpos elevados em crianças HIV infectadas. (Tejiokem *et.al.*, 2009)

3.3. Estudos de soroprevalência de anticorpos antitoxina diftérica em militares

Em 1999 o governo dos Estados Unidos recomendou em relatório específico e estratégico, realizado pelo Instituto de Medicina Militar em seu Comitê de Pesquisa de Nutrição Militar - CMNR (atualmente Divisão de Bioquímica e nutrição Militar no Instituto de Pesquisa Militar em Medicina e Meio Ambiente – USARIEM), a melhora da nutrição e função imune dos militares em combate. Este documento baseou-se em relatórios de anos anteriores (desde 1994), abordando algumas evidências como: (i) A circunstância de total estresse encontrada em militares tem consequências imunológicas. Foi evidenciado que a privação alimentar contribuiu de forma mais comum e importante para o estresse. O total de energia consumida nos alimentos aparece como uma possível modulação nutritiva na função imune, e o prolongado déficit de energia resultaram em significativa perda de peso e efeito adverso na função imune, dando assim, a importância da utilização da alimentação adequada durante as operações militares para minimizar estes efeitos; (ii) O uso da imunização profilática em militares provou benefícios quando em ações em campo, reduzindo a incidência de doenças, nas quais seus agentes poderiam estar presentes na região de combate. Comprovada pela decisão da Secretaria de Defesa de imunização sistemática de todo pessoal militar, antes mesmo do eminente risco do uso de armas biológicas; (iii) Os agentes farmacológicos tais como: aspirina, ibuprofen e

glicocorticóides, os quais modulam os efeitos das citocinas, podem ser utilizados para minimizar sinais e sintomas de reações da fase aguda induzidas pela citocinas e perda de nutrientes; (iv) Investigações futuras deveriam ser feitas para elucidar os mecanismos das mudanças do perfil imunológico da tropa em campo, bem como o uso de suplementos alimentares para minimizar as condições adversas do combate. Este relatório propôs ainda, que estudos de campo devem ser baseados nos resultados das experiências prévias conduzidas em laboratórios qualificados e acompanhamentos clínicos (CMNR, 1999)

No Exército Brasileiro, existem estudos com militares, publicados e em andamento, desenvolvidos principalmente em três grandes centros: (i) Instituto de Pesquisa da Capacitação Física do Exército (IPCFEx - www.ipcfex.ensino.eb.br) que possui dentre suas missões a de desenvolver pesquisas de capacitação física ligadas às áreas de avaliação física, biomecânica, bioquímica, cardiologia, cineantropometria, fisiologia do exercício, termorregulação, nutrição, psicofisiologia e treinamento desportivo para solução de problemas de interesse do Exército; (ii) Centro de Estudos de Pessoal do Exército (CEP - www.cep.ensino.eb.br) estabelecimento de ensino que possui entre suas missões o desenvolvimento de pesquisa de recursos humanos particularmente nas áreas de psicologia, educação, comunicação social, gestão da informação, informática e idiomas, contribuindo para o aperfeiçoamento da doutrina pedagógica aplicável ao ensino e à instrução militar; (iii) Instituto de Biologia do Exército (IBEx - www.ibex.eb.mil.br), tendo como uma das suas missões o desenvolvimento de pesquisa de doenças infecciosas de interesse militar, onde foi desenvolvida grande parte das atividades do estudo dessa dissertação.

O IBEx possui um Banco de Sangue próprio, que supri as necessidades de sangue das unidades hospitalares militares no âmbito do Rio de Janeiro, vindo a fazer também parte da Hemorede do Rio de Janeiro. Possui também, o Laboratório de Virologia, que no final de 2005, foi credenciado junto ao MS para fazer parte da Rede Nacional de Laboratórios de CD4+e CD8+, Carga viral e Genotipagem para HIV (DOU 20/06/2006, Port. nº 794 de 30/12/2005), passando a realizar exames laboratoriais de soropositivos para HIV, de militares e civis (dependentes de militares) do Exército, Marinha e Aeronáutica. Com a parceria do Ministério da Saúde com o Ministério da Defesa a família militar obteve gratuidade destes exames.

Em relação aos estudos de soroprevalência de anticorpos antitoxina diftérica em militares brasileiros, não foram observados relatos anteriores na literatura disponível. Ao contrário do Brasil, investigações neste sentido foram recentemente realizadas em países como Israel, onde a equipe médica da força de defesa de Israel publicou um estudo de soroprevalência

de anticorpos antitoxina diftérica em militares adultos jovens (18-19 anos) onde amostras de soro de 480 recrutas (263 do sexo masculino e 217 do sexo feminino) foram analisadas aleatoriamente. Os níveis de anticorpos antitoxina foram determinados por meio de ELISA. Entre os recrutas 58,1% apresentaram valores de anticorpos que lhes conferiam proteção, 38,5% apresentaram níveis de anticorpos que indicam a necessidade de dose de reforço e 3,3% níveis que indicaram nenhuma proteção e conseqüentemente a necessidade de realização do esquema de vacinação completa. Os resultados deste estudo sugeriram que a dose de reforço deveria ser dada em adultos de Israel a fim de assegurar os níveis de anticorpos protetores na população. (Cohen *et al.*, 1991).

Em um recente surto de difteria entre militares estagiários na Latvia (ou Letônia, país localizado na costa do Mar Báltico, nordeste da Europa), o risco de doença foi inferior e os níveis de anticorpos antitoxina diftérica estavam mais elevados entre os estagiários que receberam sua última dose de reforço com o antígeno toxóide diftérico com concentração superior (DT) em vez de antígenos com concentração menor dT (Oluabunwo *et al.*, 2005)

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral a pesquisa de anticorpos séricos IgG antitoxina diftérica em indivíduos adultos (militares e civis) soronegativos e soropositivos para o HIV-1.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar os níveis de anticorpos antitoxina diftérica em militares e civis doadores de sangue;
- Analisar os níveis de anticorpos antitoxina diftérica em militares e civis soropositivos para HIV-1;
- Avaliar a distribuição das subpopulações de LT CD4+ e CD8+ nos grupos de indivíduos soropositivos e soronegativos;
- Correlacionar os níveis de anticorpos IgG antitoxina diftérica com os seguintes parâmetros dos grupos de estudo: (i) sexo, (ii) faixa etária, (iii) categoria militar ou civil; (iv) vacinação prévia contra difteria; (v) número de LT CD4+ e CD8+; e entre os indivíduos HIV-1 positivos a (vi) carga viral e a (vii) terapia com antirretrovirais potentes (HAART).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. População de estudo, considerações éticas, origem e coleta das amostras de sangue.

O presente trabalho faz parte de um projeto (Nº1548-CEP/HUPE) de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, FCM/UERJ (**Anexo B**).

No estudo, participaram 180 indivíduos que, uma vez informados dos objetivos desta pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e responderam, através de entrevista, o questionário específico constante na ficha de dados clínicos e laboratoriais utilizada para acompanhamento dos voluntários, dos diversos grupos, durante o estudo (**Apêndice A e B**).

Foram coletadas pelos profissionais qualificados do IBEx as amostras de sangue dos seguintes grupos de indivíduos adultos (**Tabela 1**):

- 75 doadores do banco de sangue, incluindo 36 militares e 39 civis - familiares e dependentes de militares (23 do sexo feminino e 52 do sexo masculino) durante o mês de julho de 2006 e o mês de maio de 2008. Alíquotas de sangue total coletadas em tubos com EDTA foram utilizadas para contagem de linfócitos T CD3+/CD4+/CD8+. Posteriormente foi separado o plasma para realização da dosagem de IgG antitoxina diftérica. Foram incluídas no estudo apenas as amostras de sangue de voluntários que obtiveram resultados negativos em todos os exames clínico-laboratoriais realizados para a liberação de doação.
- 105 pacientes soropositivos para o HIV-1 (63 militares e 42 civis - familiares e dependentes de militares), sendo 38 do sexo feminino e 67 do sexo masculino. Todos foram atendidos no período de 26 de abril de 2005 a 11 de setembro de 2006 na Seção de Virologia para realização dos exames de contagem de linfócitos T CD3+/CD4+/CD8+ e carga viral. Para dosagem de IgG antitoxina diftérica, foram utilizadas alíquotas de plasma congeladas e estocadas a -80°C. Os resultados dos exames realizados na data da coleta foram extraídos do banco de informações de acompanhamento laboratorial existente no Laboratório de Virologia do IBEx e transcritos para ficha de dados clínicos e laboratoriais.

Após a realização de ensaios de dosagem dos níveis de antitoxina diftérica, os indivíduos que apresentaram anticorpos séricos antitoxina diftérica em níveis não protetores,

Tabela 1. Características gerais dos indivíduos adultos soronegativos e soropositivos para HIV-1 atendidos no Instituto de Biologia do Exército - Rio de Janeiro

Total		HAA
Nº de indivíduos	180	RT =
Idade (anos)	11-78; mediana 38; média 39,6	Tera
Sexo	Masculino $n = 119$ (66,11%) Feminino $n = 61$ (33,89%)	pia
Categoria	Militar $n = 99$ (55,00%) Civil $n = 81$ (45,00%)	antirr
Soronegativos		etrov
Nº de indivíduos	75	iral
Idade (anos)	18-64; mediana 32; média 33,55	pote
Sexo	Masculino $n = 52$ (69,33%) Feminino $n = 23$ (30,67%)	nte
Categoria	Militar $n = 36$ (48,00%) Civil $n = 39$ (52,00%)	(Hig
Soropositivos		hly
Nº de indivíduos	105	Activ
Idade (anos)	11 - 78; mediana 41; média 43,81	e
Sexo	Masculino $n = 67$ (63,81%) Feminino $n = 38$ (36,19%)	Antir
Categoria	Militar $n = 63$ (60,00%) Civil $n = 42$ (40,00%)	etrov
HAART *	Sim $n = 84$ (80,00%) Não $n = 19$ (18,00%) Não informado $n = 2$ (2,00%)	iral
		Ther
		apy)
		fora

m orientados a procurar um posto de saúde ou a unidade do Exército Brasileiro responsável pelo atendimento especializado, para a realização do procedimento de vacinação.

5.2. Métodos de coleta

Alíquotas de sangue total foram coletadas em tubos de coleta a vácuo contendo K₃EDTA e processadas no mesmo dia em temperatura ambiente. Os plasmas foram obtidos através de centrifugação 3.500 rpm durante 15 min e estocados em alíquotas na soroteca do Laboratório de Virologia do IBEx em freezer -80°C.

5.3. Ensaios de contagem de LT CD3+/CD4+/CD8+

A contagem de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ foi realizada através da imunofenotipagem em Citometro de Fluxo a Laser, BD FACSCount™, BD - Becton, Dickinson and Company – San Jose (USA).

Para a identificação de subpopulações de células pelos seus marcadores de superfície, o sangue total foi aliquotado em tubos duplos contendo os anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos específicos para os antígenos de superfície CD3+, CD4+, e CD8+ dos linfócitos T. Além dos anticorpos monoclonais, os tubos dos reagentes contêm também os grânulos fluorocromos de referência identificados que agem como um padrão fluorescente para identificar e quantificar os linfócitos. Um jogo pareado de tubos controle-reagente contendo quatro níveis de grânulos (zero, baixo, médio e elevado) é colocado na rotina do teste para verificar a exatidão e a linearidade do instrumento. Os grânulos de referência do controle calibrador são analisados pelo software interno (versões 1.1 e 1.2) e permitem a quantificação das células, tendo como resultados as contagens absolutas das células e a relação das mesmas. Toda a análise é feita automaticamente pelo FACSCount, e os resultados são impressos pelo aparelho (Strauss *et al.*, 1996).

5.4. Quantificação do RNA HIV- 1 – Carga Viral

Os dados relativos as cargas virais - HIV dos indivíduos soropositivos foram extraídos dos registros de acompanhamento dos pacientes arquivados no Laboratório de Virologia do IBEx. Para a análise da carga viral foi utilizado um kit de detecção quantitativa do RNA de HIV-1 que adota o sistema Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) de amplificação isotérmica de ácido nucléico (NucliSens HIV 1 RNA QT - NASBA; bioMérieux Clinical Diagnostics, França). A extração do RNA do plasma utilizando sílica acidificada foi realizada por metodologia descrita por Boom e colaboradores, 1990. Três RNAs sintéticos foram utilizados como controles internos das reações - Qa (concentração alta), Qb (concentração

média) e Qc (concentração baixa) (Compton, 1991; Kievits *et al.*, 1991). A hibridização foi feita em tubos com sondas marcadas com rutênio e a sua leitura por eletroquimioluminescência (ECL). O cálculo baseado nas quantidades relativas dos quatro produtos da amplificação (*amplicons*) revelou a quantidade original de HIV 1 presente na amostra do paciente. A quantidade de RNA é calculada em equipamento semi-automatizado pela relação dos sinais de Qa, Qb e Qc na ECL e expressados em números de cópias do RNA HIV-1 por mL do plasma (van Gemen *et al.*, 1993).

5.5. Ensaio imunoenzimático ELISA para a detecção de anticorpos antitoxina diftérica (IgG)

A pesquisa de IgG no soro dos indivíduos foi realizada através de um kit de ELISA obtido comercialmente (IBL Immuno-Biological Laboratories, Hamburg, Alemanha), anteriormente validado em nosso laboratório de pesquisa (Damasco *et al.*, 2005). A cada orifício das microplacas, previamente sensibilizados com toxóide diftérico purificado foram adicionados 100 µL de soro previamente diluído (1:100) em solução salina tamponada fosfatada (pH 7,2) adicionada de soro albumina bovina 1% (PBS/BSA). Após etapas de incubação a 18-25°C por 60 min e lavagens (3X 300 µL com o tampão de lavagem PBS/Tween 20), foram adicionados 100 µL de solução de anti-IgG humana conjugada à peroxidase. Após nova etapa de incubação de 30 min a 18-25°C e lavagem foram adicionados 100µL da solução reveladora contendo o substrato (H₂O₂) e dihidroclorato de tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida após 20 min a temperatura ambiente no escuro pela adição de 100 µL H₂SO₄ 0,5M. A densidade ótica (DO) foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm, com a leitura até 60 min após a colocação da solução de parada. A transformação da DO em U/ml foi feita utilizando uma curva padrão e o método Cubic Spline utilizando o software GraphPad Prism, versão 4.1. Foram considerados como imunes ou protegidos todos os indivíduos com a concentração de anticorpos superior a 1,0 UI/mL, segundo as recomendações do fabricante, conforme apresentado a seguir:

UI/mL	Interpretação
< 0,1	Imunização básica recomendada
0,1-0,9	Reforço vacinal recomendado
≥ 1,0	Indicação de imunidade contra a difteria

Fonte: IBL Immuno-Biological Laboratories, Hamburg, Alemanha

5.6. Análise estatística

Para os dados com distribuição normal e soros não pareados utilizou-se o teste t pareado (*Paired t-test*) admitindo 95% de intervalo de confiança (95%IC). Aos soros não pareados aplicou-se o (*unpaired t - test*) também admitindo 95%IC. Para os valores em que a distribuição dos valores não seguiu a normalidade, utilizou-se o teste de Wilcoxon (*Wilcoxon matched pairs test*). Todos os teste utilizaram o *software GraphPad Prism 4.0*. Os testes de correlação foram analisados utilizando o mesmo software, empregando-se o teste de *Pearson* (distribuição normal) ou *Spearman* (distribuição não normal). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Níveis de anticorpos antitoxina diftérica

Na **Tabela 2** está demonstrada a distribuição dos níveis de antitoxina diftérica IgG da população total estudada (180 indivíduos adultos) atendidos no IBEx, independente da faixa etária, sexo, categoria (civil ou militar) e soropositividade para o HIV-1. Cinco (2,78%) indivíduos não apresentaram níveis protetores de IgG ($< 0,1$ UI/mL) contra a doença, enquanto 57,22% apresentaram proteção parcial (IgG $\geq 0,1 < 1,0$ UI/mL), e deste modo, necessitavam de dose reforço imediata da vacina. Apenas uma proporção de 40% de indivíduos adultos tinha níveis adequados de proteção de anticorpos ($\geq 1,0$ UI / mL).

No grupo de soronegativos para o HIV-1, foram analisados os níveis de antitoxina diftérica IgG de 75 indivíduos doadores de sangue, independente da faixa etária, sexo, categoria (civil ou militar). A maior proporção de indivíduos (56%) foi considerada protegida contra a doença ($\geq 1,0$ UI / mL), enquanto 42,67% apresentaram proteção parcial (IgG $\geq 0,1 < 1,0$ UI/mL). Apenas um (1,33%) indivíduo apresentou nível de IgG $< 0,1$ UI/mL.

Dentre os 105 indivíduos soropositivos para o HIV-1, 4 (3,81%) não apresentaram níveis protetores de IgG ($< 0,1$ UI/mL) e apenas 30 (28,57%) indivíduos foram considerados protegidos com nível de IgG $\geq 1,0$ UI / mL. A maioria (67,62% -71 indivíduos) foi considerada parcialmente imunizada (IgG $\geq 0,1 < 1,0$ UI/mL).

6.2 Correlação entre os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e o sexo

Os níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos soronegativos ($n=75$) e soropositivos ($n=105$) para HIV-1, estratificados por sexo estão apresentados na **Tabela 3**.

Tanto para os indivíduos do sexo masculino ($n=119$) quanto para os do sexo feminino ($n=61$), aproximadamente 57% apresentaram níveis IgG $\geq 0,1 < 1,0$ UI/mL; 38,65% e 42,62% apresentaram níveis IgG $\geq 1,0$ UI/mL, respectivamente. Os cinco indivíduos desprotegidos (IgG $< 0,1$ UI/mL) contra a doença eram do sexo masculino.

No grupo dos 75 indivíduos soronegativos, mais da metade dos indivíduos do sexo masculino (51,92%) e do sexo feminino (65,22%) apresentaram níveis IgG $\geq 1,0$ UI/mL. Por outro lado, apenas 28,60% de ambos os sexos apresentaram níveis IgG $\geq 1,0$ UI/mL no grupo dos 105 indivíduos soropositivos.

Tabela 2. Níveis de IgG antitoxina diftérica (UI/mL) e de linfócitos T CD4+ e CD8+ dos indivíduos atendidos no Instituto de Biologia do Exército – RJ

Total dos indivíduos	180
Anticorpos IgG antitoxina diftérica (UI/mL)	
< 0,1	5 (2,78%)
≥ 0,1 < 1,0	103 (57,22%)
≥ 1,0	72 (40,00%)
Soronegativos	75
Anticorpos IgG antitoxina diftérica (UI/mL)	
< 0,1	1 (1,33%)
≥ 0,1 < 1,0	32 (42,67%)
≥ 1,0	42 (56,00%)
LT CD4+ (células/mm ³)	321-2103; mediana 819; média 883,21
LT CD8+ (células/mm ³)	131-1242; mediana 496; média 549,96
Relação CD4:CD8	0,73-6,30; mediana 1,57; média 1,78
Soropositivos	105
Anticorpos IgG antitoxina diftérica (UI/mL)	
< 0,1	4 (3,81%)
≥ 0,1 < 1,0	71 (67,62%)
≥ 1,0	30 (28,57%)
LT CD4+ (células/mm ³)	13 - 930; mediana 408; média 414,4
LT CD8+ (células/mm ³)	262 - 2879; mediana 654; média 1037,31
Relação CD4:CD8	0,01 – 2,51; mediana 0,41; média 0,47

Tabela 3. Níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos soronegativos e soropositivos para HIV-1, estratificados por sexo

	<i>n</i>	Percentuais e números absolutos (n) de indivíduos com níveis de IgG (UI/mL)		
		< 0,1	≥ 0,1 e < 1,0	≥ 1,0
Total de Indivíduos	180			
Sexo				
Masculino	119	4,20 (5)	57,14 (68)	38,65 (46)
Feminino	61	0	57,38 (35)	42,62 (26)
Soronegativos	75			
Masculino	52	1,92 (1)	46,15 (24)	51,92 (27)
Feminino	23	0	34,78 (8)	65,22 (15)
Soropositivos	105			
Masculino	67	5,97 (4)	65,67 (44)	28,35 (19)
Feminino	38	0	71,05 (27)	28,95 (11)

6.3 Correlação entre os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e as faixas etárias

Na **Tabela 4** estão apresentados os níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica dos indivíduos soronegativos e soropositivos para HIV-1 estratificados por faixas etárias. No grupo de soronegativos foi observado um maior número de indivíduos (74,70%) protegidos na faixa etária de 18 – 30 anos (média geométrica de 0,70 UI/mL); apenas 20,83% dos indivíduos soropositivos desta mesma faixa etária estavam protegidos. Nas diversas faixas etárias de indivíduos soronegativos o percentual de proteção variou entre 50% a 75%. Entretanto, no grupo dos soropositivos, o percentual de proteção variou de 12,50% (41 – 50 anos) a 36,84% (51 a 60 anos).

6.4 Correlação entre os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e a categoria (civil e militar)

Na **Tabela 5** estão apresentados os níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica dos indivíduos doadores de sangue – civis e militares estratificados em duas faixas etárias. Na população civil aproximadamente 50% dos indivíduos em ambas as faixas etárias estavam desprotegidos ou parcialmente protegidos. Entretanto, nas diferentes faixas etárias do grupo de militares, os níveis de anticorpos variaram significativamente. Um percentual de 72% dos militares entre 18 – 32 anos estavam protegidos. Em contraste, a maioria dos militares da faixa dos 33 – 64 anos estava parcialmente protegida (63,60%).

Para investigar se houve uma faixa de idade com maior suscetibilidade à difteria, os indivíduos foram classificados com mais um grupo etário (**Tabela 6**). Para os militares, a percentagem de indivíduos com níveis de proteção de anticorpos foi dependente da idade. A maioria (62,5%) dos militares não protegidos ou parcialmente protegidos pertencia ao grupo de 41 a 64 anos. Em contrapartida, a maioria (71,4%) dos jovens militares (18 a 30 anos) estava completamente protegida contra a doença. Cerca de metade dos militares com 31 a 40 anos também estava protegida contra difteria. Com relação aos civis, cerca de 50% dos indivíduos entre 18 e 30 anos e 63,6% dos indivíduos entre 41 e 64 anos apresentavam níveis de anticorpos de proteção à difteria.

Tabela 4. Níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos soronegativos e soropositivos para HIV-1 estratificados por faixas etárias

Faixa etária	n	Média Geométrica anticorpos (UI/mL)	Percentuais e números absolutos (n) de indivíduos por níveis de IgG		
			< 0,1	≥ 0,1 e < 1,0	≥ 1,0
Soronegativos					
18 – 30	34	0,70	0	35,29 (12)	74,70 (22)
31 – 40	21	0,60	0	52,38 (11)	47,62 (10)
41 – 50	15	0,54	6,67 (1)	33,33 (5)	60,00 (9)
51 – 60	2	0,52	0	50,00 (1)	50,00 (1)
61 – 64	3	0,32	0	100,00 (3)	0
Total	75	0,67	1,33 (1)	42,67 (32)	56,00 (42)
Soropositivos					
<18	2	0,38	0	50,00 (1)	50,00 (1)
18 – 30	24	0,41	8,33 (2)	70,83 (17)	20,83 (5)
31 – 40	25	0,40	4,00 (1)	60,00 (15)	36,00 (9)
41 – 50	16	0,39	0	87,50 (14)	12,50 (2)
51 – 60	19	0,50	0	63,16 (12)	36,84 (7)
61 – 78	19	0,46	5,25 (1)	63,16 (12)	31,58 (6)
Total	105	0,43	3,81 (4)	67,62 (71)	28,57 (30)

Tabela 5. Percentual dos níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos doadores de sangue - civis ($n = 39$) e militares ($n = 36$) - estratificados em duas faixas etárias

Faixas etárias (anos)	IgG (UI/mL) antitoxina diftérica			
	$\geq 0,1 < 1,0$		$\geq 1,0$	
	Civil	Militar	Civil	Militar
18 – 32	50 (7/14)	28 (7/25)	50 (7/14)	72 (18/25)
33 – 64	44 (11/25) ^a	63,6 (7/11)	52 (13/25)	36,4(4/11)
Total : 18 – 64	46 (18/39)	39 (14/36)	51 (20/39)	61 (22/36)

^a um indivíduo de 49 anos de idade (4%) apresentou IgG específica < 0.1 UI/mL

Tabela 6. Percentual dos níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos doadores de sangue - civis ($n = 39$) e militares ($n = 36$) estratificados por faixas etárias

Faixas etárias (anos)	IgG (UI/mL) antitoxina diftérica			
	$\geq 0.1 < 1$		≥ 1	
	Civil	Militar	Civil	Militar
18 - 30	46 (6/13)	29 (6/21)	54 (7/13)	71 (15/21)
31 - 40	57 (8/14)	43 (3/7)	43 (6/14)	57 (4/7)
41 - 64	36 (4/11) ^a	63 (5/8)	64 (7/11)	37 (3/8)

^a um indivíduo de 49 anos de idade (4%) apresentou IgG específica < 0.1 UI/mL

Foi observado, através da média geométrica dos níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica, que entre os indivíduos doadores de sangue ($n=75$), quando estratificado por categoria, os civis apresentavam distribuição homogênea de IgG independente da faixa etária, conforme demonstrado na **Tabela 7**. A diferença nos níveis de anticorpos entre militares de 18-30 anos (média geométrica de 0,82 UI/mL) e 41-64 anos (média geométrica de 0,51 UI/mL) após a aplicação de cálculos estatísticos não foi significativa ($p = 0,053$).

A **Figura 2** demonstra a correlação negativa entre anticorpos contra difteria e a idade dos militares, ($p = 0,016$; coeficiente de correlação negativo, $r = - 0,4$). Entre os civis não foi observada associação ($p = 0,6$; $r = 0,08$) entre os níveis de anticorpos e a idade.

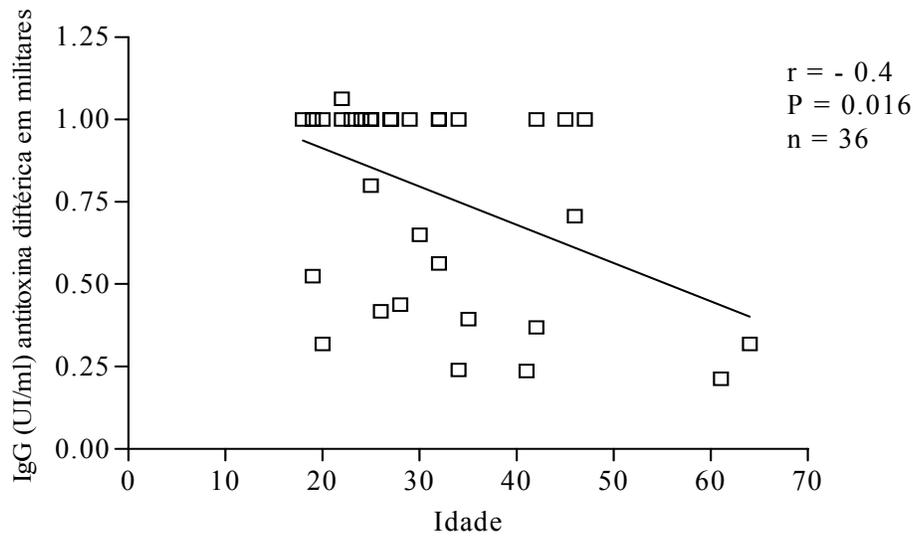
Dados mostrados na **Tabela 8** indicam que apenas 59% dos indivíduos que relataram ter recebido reforço da vacina dT na idade adulta estavam protegidos contra a doença ($IgG \geq 1,0$ UI/mL). De acordo com os nossos registros de vacinação durante a idade adulta, 24 indivíduos militares e 15 indivíduos civis relataram que receberam uma dose de reforço após a imunização primária de zero a 12 anos (média de 4,2 anos). Os dados da **Tabela 9** indicaram uma maior proporção de indivíduos militares completamente protegidos (72%) quando comparados com os civis que receberam reforço na idade adulta. Na faixa etária de 33 – 64 anos apenas 33% dos militares imunizados na fase adulta apresentaram níveis de $IgG \geq 1,0$ UI/mL. Nesta mesma faixa etária, o dobro do percentual de civis estava completamente imunizado.

Na **Tabela 10** estão apresentados os percentuais dos níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica dos indivíduos soropositivos – civis e militares estratificados por faixas etárias. Uma resposta homogênea (57 a 75%) foi observada entre indivíduos civis e militares parcialmente protegidos ($IgG \geq 0,1 < 1,0$ UI/mL) contra difteria. Em ambas as categorias (civil e militar) apresentaram uma pequena proporção de 29% de indivíduos considerados protegidos. Os dados demonstraram ainda, 4 militares que não apresentavam níveis protetores de IgG ($< 0,1$ UI/mL) contra a difteria, sendo 2 na faixa etária de 18 a 30 anos, 1 na faixa de 31 a 40 anos e 1 na faixa de 61 a 78 anos; todos do sexo masculino e sem relato de vacinação contra difteria nos últimos dez anos.

Tabela 7. Média geométrica (I C 95%; *n*) dos níveis de IgG antitoxina diftérica (UI/mL) em amostras de doadores de sangue (soronegativos)

Faial etária	Civil	Militar
18 – 30	0,53 (0,33-0,86; 13)	0,82 (0,70-0,97; 21)
31 - 40	0,56 (0,37-0,85; 14)	0,66 (0,38-1,2; 7)
41 - 64	0,51 (0,27-0,95; 12)	0,51 (0,29-0,88; 8)

A)



B)

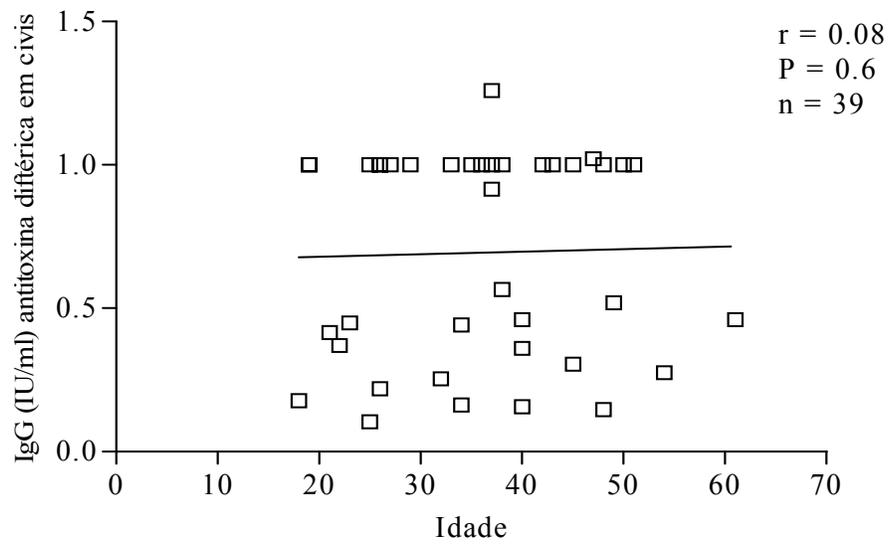


FIGURA 2 – Correlação entre níveis de anticorpos contra difteria e a idade dos indivíduos soronegativos para HIV-1: A) militares e B) civis

Tabela 8. Percentual de indivíduos protegidos ($\text{IgG} \geq 1,0 \text{ UI/mL}$) ou parcialmente protegidos ($\text{IgG} \geq 0,1 < 1,0 \text{ UI/mL}$) que receberam reforço vacinal para difteria em idade adulta.

Faixa etária (anos)	IgG (UI/mL) antitoxina diftérica	
	$\geq 0.1 < 1$	≥ 1
18 – 32	35 (8/23)	65 (15/23)
33 -64	50 (8/16)	50 (8/16)
Total: 18 - 64	41 (16/39)	59 (23/39)

Tabela 9. Percentual de indivíduos protegidos ($\text{IgG} \geq 1,0$ UI/mL) ou parcialmente protegidos ($\text{IgG} \geq 0,1 < 1,0$ UI/mL) que receberam reforço vacinal para difteria em idade adulta distribuídos por categoria (civil e militar).

Faixa etária (anos)	IgG (UI/mL) antitoxina diftérica			
	$\geq 0,1 < 1,0$		$\geq 1,0$	
	Civil	Militar	Civil	Militar
18 – 32	60 (3/5)	28 (5/18)	40 (2/5)	72 (13/18)
33 -64	40 (4/10)	67 (4/6)	60 (6/10)	33 (2/6)
Total: 18 - 64	47 (7/15)	37.5 (9/24)	53 (8/15)	62.5 (15/24)

Tabela 10. Percentual dos níveis de IgG (UI/mL) antitoxina diftérica em indivíduos soropositivos para HIV-1 estratificados por faixas etárias

Faixa etária (anos)	IgG (UI/mL) antitoxina diftérica			
	$\geq 0,1 < 1,0$		$\geq 1,0$	
	Civil	Militar	Civil	Militar
11 – 30	75 (6/8)	67 (12/18) *	25 (2/8)	22 (4/18)
31 – 40	64 (7/11)	57 (8/14)**	36 (4/11)	36 (5/14)
41 – 78	74 (17/23)	68 (21/31)**	26 (6/23)	29 (9/31)
11 - 78	71 (30/42)	61 (41/67)	29 (12/42)	29 (18/63)

* 2 indivíduos (11%) com IgG antitoxina diftérica < 0.1 UI/mL.

** 1 indivíduo (na faixa etária de 31 a 40 anos -7% e outro na faixa de 41 a 78 anos - 3%) com IgG antitoxina diftérica < 0.1 UI/mL.

No grupo dos soropositivos, durante a entrevista, somente 7 indivíduos (5,6 %) informaram, antes da coleta de sangue, que tinham sido recentemente vacinados contra a difteria, com uma média de 10,6 meses (variando de 27 dias a 30 meses). Conforme as orientações da equipe de pesquisa, apenas 5 pacientes parcialmente protegidos contra difteria receberam uma dose de reforço da vacina contra difteria (dT) e após 14 dias, retornaram para segunda coleta e apresentaram níveis de anticorpos específico $\geq 1,0$ UI/mL (níveis de proteção).

Médias geométricas similares de IgG antitoxina diftérica foram encontradas em pacientes civis (0,45 UI/mL) e militares (0,41 UI/mL) nos diferentes grupos de idade (**Figura 3**).

6.5 Correlação entre os níveis de anticorpos antitoxina diftérica e a contagem de LT CD4+

A média geométrica da concentração de IgG específica detectada entre indivíduos de diferentes grupos de CD4+ (≥ 500 , $\geq 200 < 500$ e < 200) variaram de 0,41 a 0,47 UI/mL ($p > 0,05$). Os percentuais de indivíduos protegidos contra difteria foram similares entre os grupos e variaram entre 25 a 34%. (**Figura 4**)

A **Tabela 11** demonstra uma inversão na distribuição de LT CD4+ e CD8+ em pacientes soropositivos para HIV-1. Foi observada uma redução significativa dos valores de LT CD4+, que variou de 362 a 438 células/ μ l, sem apresentar diferença entre os grupos etários. Os valores encontrados para as LT CD8+ foram significativamente superiores, variou de 1020 a 1086 células/ μ l e quando comparados com os valores considerados normais para indivíduos soronegativos, segundo o fabricante do kit. Conseqüentemente, a relação de CD4:CD8 foi significativamente baixa ($P < 0,05$), com o valor da média de 0,44

Em relação à distribuição das subpopulações de LT e os níveis de anticorpos IgG antitoxina diftérica de acordo com o sexo, foi demonstrado que apresentam perfil semelhante (**Figura 5**) entre os pacientes HIV positivos masculinos e femininos.

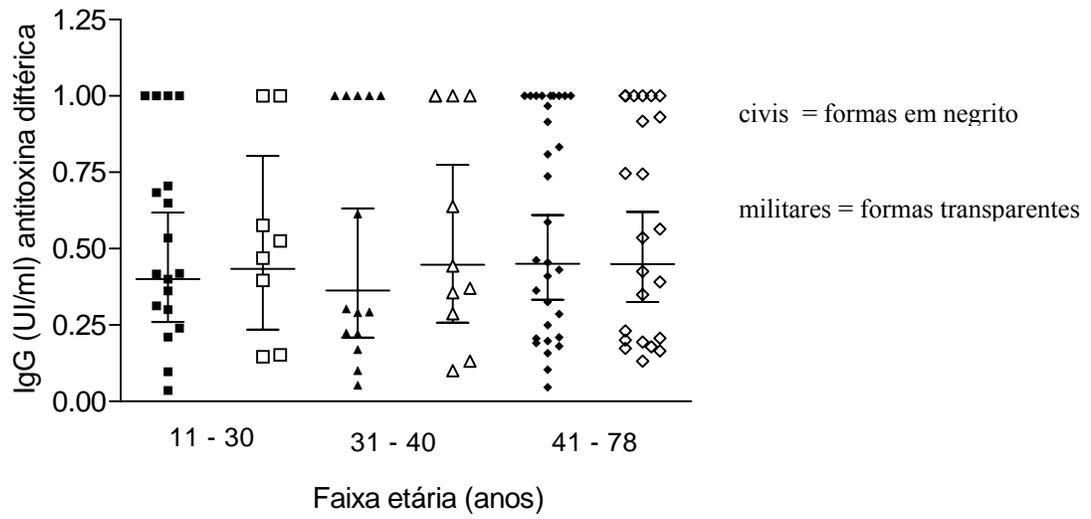


FIGURA 3 – Média geométrica (IC 95%) da concentração de IgG antitoxina diftérica em militares e civis soropositivos para HIV-1 distribuídos por faixas etárias

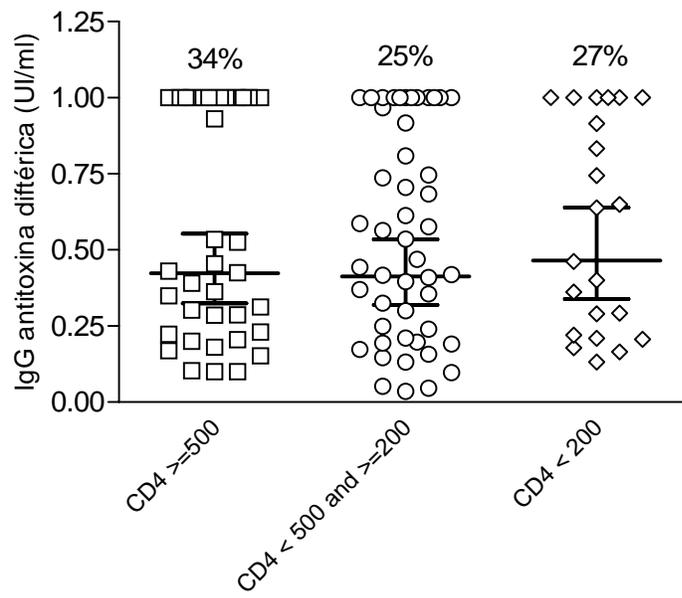


FIGURA 4 - Média geométrica (IC 95%) da concentração de IgG antitoxina diftérica em militares e civis soropositivos para HIV-1 classificados por número de LT CD4+, com seus respectivos percentuais de anticorpos protetores.

Tabela 11. Média (I C 95%) para a contagem de linfócitos T (células/ μ l) em indivíduos soropositivos para HIV-1 distribuídos por faixa etária.

Faixa etária (<i>n</i>)	CD4+	CD8+	CD4:CD8
11 – 30 (26)	420 (345-495)	1023* (869-1177)	0.45 (0.37-0.53)
31 – 40 (25)	362 (258-465)	1086* (846-1326)	0.36 (0.25-0.48)
41 – 78 (54)	438 (375-500)	1020* (882-1157)	0.52 (0.40-0.64)

* $p < 0,05$ quando comparados com os valores de CD4+

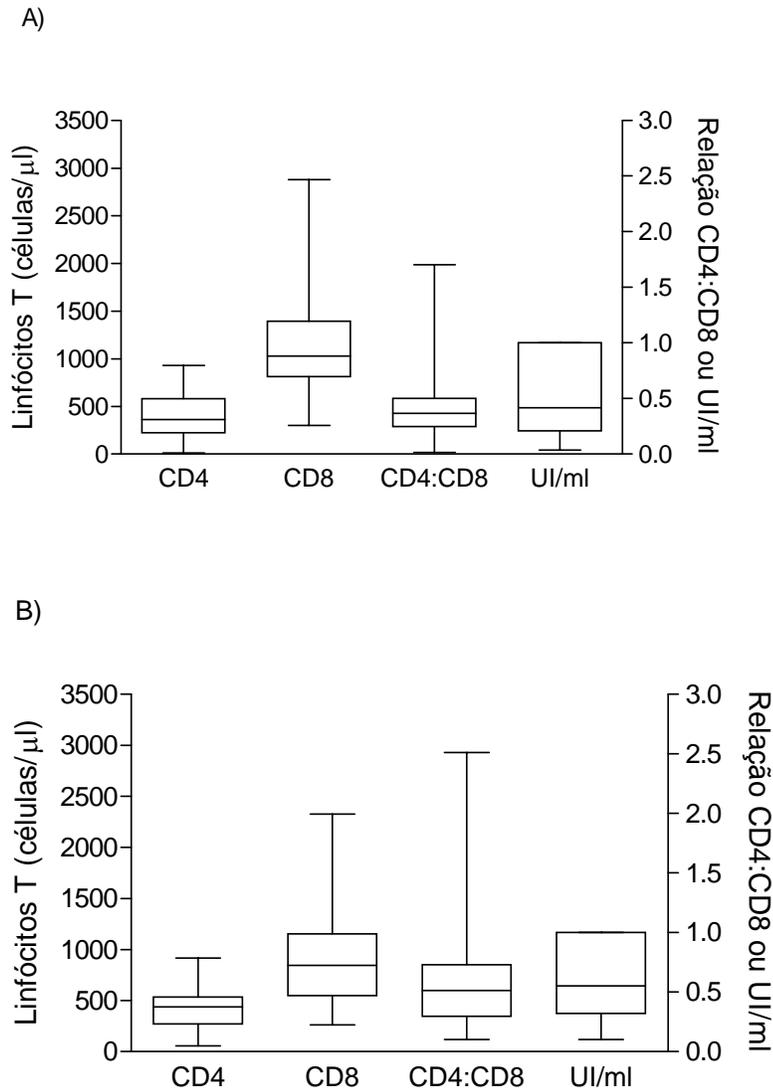


FIGURA 5 – Demonstração da distribuição dos fenótipos dos LT, a relação CD4+:CD8+ e a concentração de IgG antitoxina diftérica em indivíduos soronegativos para HIV-1 de acordo com o gênero. A) Masculino ($n= 67$), B) Feminino ($n= 38$). Com as barras do gráfico representando os 25 e 75 percentis a linha da média e os valores máximos e mínimos

6.6 Correlação entre os níveis de anticorpos IgG antitoxina diftérica e a terapia com antirretrovirais potentes (HAART)

Apesar do tamanho amostral reduzido, pacientes que não utilizavam antirretrovirais (n = 19) tinham níveis de IgG antitoxina diftérica (média geométrica 0,58 UI/mL) e carga viral (média de log de 3.9) mais elevados em comparação com pacientes em uso dos antirretrovirais (n = 84; média geométrica 0,39 UI/mL e carga viral média de log de 2,5). Aproximadamente 26% dos pacientes em uso de HAART tinham níveis de anticorpos protetores contra difteria (> 1,0 UI/mL) em comparação com 37 % dos pacientes sem uso de HAART.

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nas contagens de linfócitos T CD4+, T CD8+, na relação CD4: CD8 entre os pacientes com ou sem o uso de antirretrovirais ($p > 0,05$) (**Figura 6**).

A proporção de indivíduos civis e militares foi semelhante nos pacientes tratados com antirretrovirais potentes (61 % eram militares) e pacientes não tratados (58 % eram militares). Observou-se também, que a média e mediana de idade dos pacientes tratados eram 46 e 43 anos respectivamente enquanto para os sem uso de antirretrovirais eram 35 e 30 anos. Além disso, baseado na data da coleta da amostra estudada e a data do diagnóstico do paciente HIV-1 positivo, observamos que os pacientes que não faziam uso de antirretrovirais tinha menos tempo de tomada de conhecimento de que estava infectado com HIV (média de 4,1 anos) em comparação com pacientes tratados com antirretrovirais (média de 6,5 anos). O tempo médio de tratamento com antirretrovirais entre os pacientes foi de 3,7 anos. Com relação à vacinação contra difteria na fase adulta, 3 dos 4 pacientes com uso de antirretrovirais potentes possuíam anticorpos em níveis de proteção. Dos dois pacientes sem uso de antirretrovirais que relataram vacinação na fase adulta apenas um apresentou níveis de proteção.

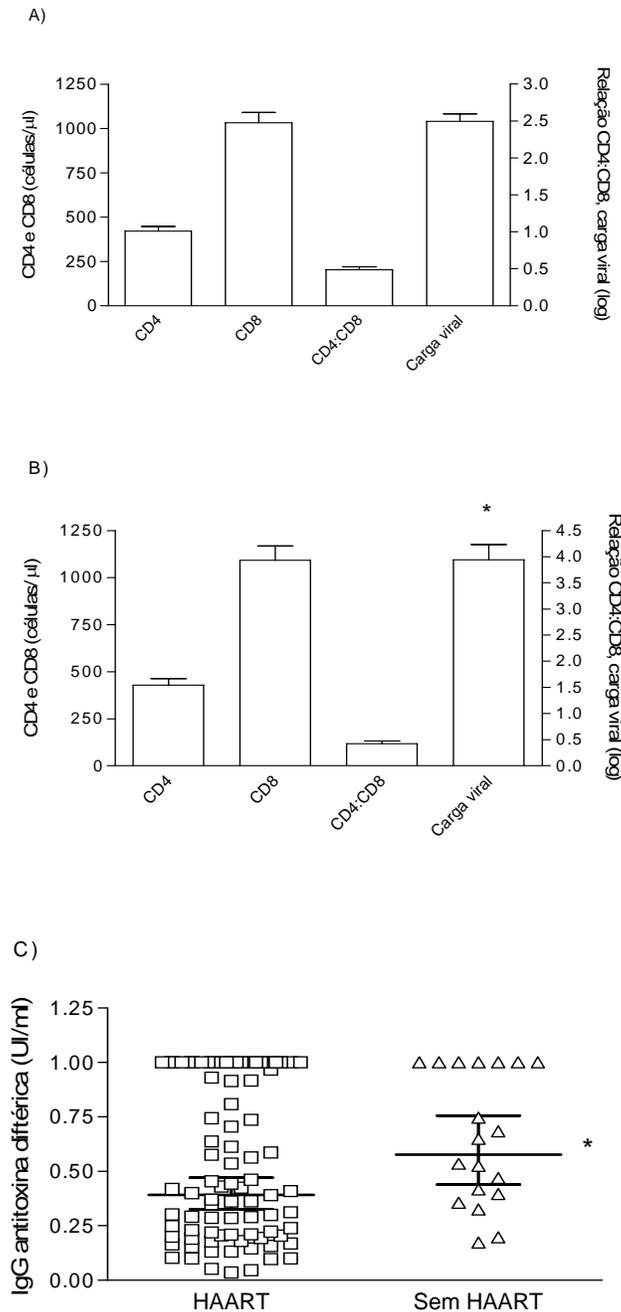


FIGURA 6 – Distribuição da média das subpopulações de LT; relação CD4+:CD8+ e Carga viral. A) Indivíduos soropositivos para o HIV-1, fazendo uso do HAART ($n = 84$). B) Indivíduos soropositivos para o HIV-1, sem uso do HAART ($n = 19$). C) Média geométrica (IC 95%) da concentração de IgG antitoxina diftérica em militares e civis soropositivos para HIV-1 comparados com os indivíduos em uso de HAART ou não.

* $p < 0,05$ comparados com pacientes em uso de HAART ou não.

7. DISCUSSÃO

A proteção contra a difteria está associada ao desenvolvimento de anticorpos capazes de neutralizar a ação da toxina (Ipsen, 1946). A pesquisa de anticorpos neutralizantes é realizada através de ensaios *in vivo* de difícil execução. Melville-Smith e Balfour (1988) realizaram um estudo comparativo dos resultados obtidos pelo ensaio de neutralização de toxina em cultura de células e pelos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e concluíram que o ELISA poderia ser utilizado como um método alternativo na pesquisa de anticorpos específicos antitoxina diftérica em soros humanos em níveis correspondentes ou superiores a 0,1 UI/mL. Apesar de alguns estudos continuarem sendo realizados com testes de ELISA produzidos *in house* (Kristiansen, Aggerbeck & Heron, 1997), atualmente, vários kits de ELISA para dosagem de níveis de anticorpos IgG específicos para toxina da difteria são produzidos por diferentes empresas especializadas e encontram-se comercialmente disponíveis. A revalidação do kit de ELISA utilizado no presente estudo foi anteriormente realizada em nosso laboratório (Damasco *et al.*, 2005). Para este kit de ELISA, as concentrações de anticorpos IgG antitoxina diftérica foram relacionadas pelo fabricante aos prováveis níveis de imunidade dos indivíduos, a seguir: ausência de proteção (<0,1UI/mL), proteção inadequada (0,1 - 0,9 UI/mL) e proteção completa ($\geq 1,0$ UI/ mL).

Embora a incidência mundial de difteria tenha reduzido drasticamente após a implantação do Programa Internacional de Imunização (Galazka, 2000), estudos realizados na América do Norte (Golaz *et al.*, 2000; McQuillan *et al.*, 2002) e na Europa (Marlovits *et al.*, 2000; Volzke *et al.*, 2006) demonstraram que a população de adultos não estava completamente protegida contra a doença. Durante a epidemia de difteria no Leste Europeu, registrou-se que a maior taxa de mortalidade (62%) foi em indivíduos entre 41 a 64 anos (Rakhmanova *et al.*, 1996; Brennan *et al.*, 2000). Esta observação resultou na recomendação de doses de reforço de toxóide diftérico a cada dez anos em vários países nos diferentes continentes (Cohen *et al.*, 1994; McQuillan *et al.*, 2002). Em países como a Finlândia, onde os níveis de imunização foram considerados ótimos, já existe a preocupação com os riscos de hiperimunização da população, particularmente para os militares. Este fato pareceu ser decorrente da implantação de programa de imunização de adultos direcionado inicialmente apenas a este grupo de indivíduos (Ölander *et al.*, 2009). Por outro lado, em muitas regiões do globo a imunização de adultos ainda não é

observada ou regulamentada, particularmente nos países em desenvolvimento incluindo o Brasil.

No Brasil, apesar da extensão continental, os estudos soroepidemiológicos de difteria têm sido realizados principalmente nos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. O primeiro estudo realizado no Rio de Janeiro, no ano de 2002, demonstrou que apenas 30,7% da população de doadores de sangue (18-61 anos) estudada apresentaram proteção total contra a doença ($\geq 1,0$ UI/ mL) (Damasco *et al.*, 2005). Sete anos depois, os dados obtidos no presente estudo demonstraram que 51% de doadores de sangue (civis) estavam protegidos. O aumento no número de indivíduos adultos sadios com níveis adequados de proteção contra a difteria ($\geq 1,0$ UI/ mL) pode estar relacionado com as diferentes condições sócio-econômicas dos grupos de doadores de sangue estudados em 2002 (indivíduos atendidos na rede hospitalar do setor público) e em 2006 a 2008 (familiares, parentes ou amigos de militares) e com a melhoria do programa de imunização de adultos do município do Rio de Janeiro. Por outro lado, os nossos dados demonstraram que uma menor proporção da população de adultos no Estado do Rio de Janeiro está completamente protegida contra difteria quando comparado com o Estado de São Paulo. Curiosamente, o estudo realizado em São Paulo demonstrou que um percentual de 84% da população adulta estava completamente imunizada (Divino-Goes *et al.*, 2007). Estas diferenças de resultados podem estar parcialmente relacionadas com a dimensão continental do território nacional, heterogeneidade tanto na qualidade do serviço de saúde quanto nas condições socioeconômicas das populações urbanas e rurais, além da ausência de padronização de metodologias laboratoriais utilizadas nos estudos.

Os resultados obtidos nos estudos realizados no Rio de Janeiro foram semelhantes aos obtidos em outros países e diferente dos obtidos no Estado de São Paulo. Mesmo para os Estados Unidos, foi observada proteção total contra difteria apenas para 47% dos indivíduos com idade superior a 20 anos (Mc Quillan *et al.*, 2002). Na Áustria, foi relatado níveis de anticorpos protetores em 46,4% dos adultos. A proporção de adultos com proteção adequada foi inversamente proporcional ao aumento da idade da população (Marlovits *et al.*, 2000). Na Espanha, apesar de 95% das crianças até 9 anos apresentarem níveis protetores de anticorpos, apenas 32,3% dos indivíduos na faixa etária de 30-39 anos estavam completamente protegidos contra a difteria (Instituto de Saúde Carlos III, Espanha, 2000). Na Turquia, 56% da população entre 20 e 81 anos de idade exibiu níveis inadequados de imunidade. O maior percentual de

baixa imunidade (30,6%) foi observado na faixa etária de 40 a 49 anos (Alp Carvus, Oguuz & Yuce, 2007).

A última portaria ministerial (Nº 1.602 de 17 de Julho de 2006) institui em todo o território nacional, os calendários de vacinação da criança, do adolescente, do adulto e do idoso e estabelece que o cumprimento das vacinações seja comprovado por meio de atestado de vacinação emitido pelos serviços públicos de saúde ou por médicos em exercício de atividades privadas. Cinco anos após as primeiras recomendações do Ministério da Saúde relativas a administração de doses reforço em adultos (Portaria Nº 597/GM Em 8 de abril de 2004, antecedeu a que esta em vigor) e 3 anos após a portaria de 2006 os resultados do presente estudo demonstraram que quase a metade da população adulta no Rio de Janeiro ainda permanece inadequadamente protegida contra difteria (49%), incluindo os militares.

Os nossos dados indicaram uma diferença significativa nos níveis de anticorpos contra difteria entre os civis e os militares. A semelhança do observado em outros países (Cohen *et al.*, 1991, Oluabunwo *et al.*, 2005 e Ölander *et al.*, 2009), uma maior proporção (71%) de jovens militares (18 a 30 anos) estava protegida contra difteria em comparação com os civis (54%) da mesma faixa etária. Estas diferenças podem ser explicadas pelo maior cuidado com o estado de saúde dos militares e as medidas profiláticas adotadas no período que antecede os exercícios de treinamento militar ou no emprego da tropa em missões reais. Estes cuidados com a saúde são ainda mais frequentes com o grupo efetivo de militares de menor faixa etária. Cabe ressaltar, que conforme relato dos voluntários durante a entrevista realizada no presente estudo, muitas das vezes no momento da aplicação do reforço vacinal em jovens militares, não havendo comprovação com o porte do cartão de vacinação, eles receberam a dose de reforço indistintamente. No presente estudo, assim como em outros trabalhos consultados na literatura disponível, foram raras as oportunidades em que foram apresentados os comprovantes de imunização dos participantes, sendo, portanto, levado em consideração o relato verbal do voluntário participante da pesquisa.

Os estudos mais recentes de soropidemiologia de difteria relacionados com militares foram realizados em Israel (Cohen *et al.*, 1991) e Latvia (Oluabunwo *et al.*, 2005). Em Israel, 58,1% dos recrutas jovens estavam adequadamente protegidos, 38,5% apresentavam a necessidade de dose de reforço imediata e 3,3% estavam completamente desprotegidos e necessitavam ser submetidos ao esquema completo de vacinação. Os autores sugeriram que doses de reforço de toxóide diftérico deveriam ser administradas na população de adultos para

assegurar os níveis de proteção contra a difteria na população israelense (Cohen *et al.*, 1991). Na Latvia ocorreu um surto de difteria entre militares estagiários. Um menor número de casos foi observado para os estagiários que receberam sua última dose de reforço com o antígeno toxóide diftérico de concentração superior (DT) em vez de antígenos de concentração inferior (dT) e apresentavam níveis de anticorpos antitoxina diftérica mais elevados (Oluabunwo *et al.*, 2005). Estes achados sugerem que estudos sorológicos específicos devem ser conduzidos nas mais diversas subpopulações e faixas etárias, para se definir o intervalo ideal para revacinação na população adulta, além da concentração de antígeno (toxóide diftérico) que deve ser utilizada nas doses de reforço. No Brasil, o Programa Nacional de Imunização recomenda para adultos, incluindo os idosos, a imunização com a vacina dT. Para as crianças acima de sete anos, quando houver indicação, também devem receber a vacina dupla do tipo adulto (dT), que contém dose reduzida do componente diftérico. A vacina dupla infantil (DT) deve ser administrada somente em crianças que tenham contra-indicações para receber a vacina tríplice (DPT) ou tenham tido coqueluche. Tanto a vacina DPT quanto a DT pode ser utilizada em crianças que ainda não completaram sete anos de idade.

No estudo com ensaios de neutralização de anticorpos em células *vero* foi demonstrada uma baixa prevalência de níveis de anticorpos neutralizantes contra difteria na população adulta saudável do Rio de Janeiro, a maioria (41,6%) dos indivíduos desprotegidos pertencia à faixa etária de 41-50 anos de idade (Pimenta *et. al.*, 2006). No presente estudo, dentro da faixa etária de 41-64 anos 62% dos militares encontravam-se desprotegidos. Os dados sugerem que os militares nesta faixa etária, deveriam receber uma série de vacinação completa ou uma dose de reforço da vacina contra difteria, o mais breve possível. Os resultados aqui apresentados também sugerem as mesmas preocupações em relação aos civis, uma vez que cerca de 50 % desses indivíduos estavam desprotegidos contra a doença.

O conhecimento da imunidade por faixa etária torna-se relevante, visto que uma população específica pode apresentar dados diferentes do esperado. O exemplo deste fato foi o estudo de Divino-Goes e colaboradores (2007) que observaram uma diminuição de níveis de anticorpos na faixa etária de 40 a 59 anos e o aumento de anticorpos na faixa etária de indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos, justificada pelos autores pela imunização em campanha nacional de vacinação em idosos contra influenza, pneumococos, tétano e difteria iniciada em 1999. Estes dados foram comprovados por um grupo de pesquisadores que selecionaram 98 idosos com idade média de 84 anos que participaram da campanha de

vacinação e receberam a dT e coletaram sangue antes da vacinação e 30 dias após, para a dosagem de anticorpos específico para antitoxina diftérica. Foi observado que 18% estavam suscetíveis à difteria antes da vacina e após a dose de reforço 78% tornaram-se protegidos contra difteria 13% necessitavam de vacinação básica e 9% continuou suscetível à difteria (Weckx et al., 2006). Este estudo, assim como o realizado na Finlândia (Ölander *et al.*, 2009) comprovam os benefícios e a eficácia da revacinação de reforço em adultos. Portanto, o nosso estudo também enfatiza a necessidade de maior incentivo a aplicação de doses de reforço em adultos civis e militares, especialmente para faixa de 41 a 64 anos de idade em nossa comunidade.

Conforme recomendações do Ministério da Saúde do Brasil para a terapia e a imunização de indivíduos infectados pelo HIV, à medida que aumenta a imunodepressão, eleva-se também o risco relacionado à administração de vacinas de agentes vivos, bem como se reduz a possibilidade de resposta imunológica consistente. Sempre que possível, deve-se adiar a administração de vacinas em pacientes sintomáticos ou com imunodeficiência grave (contagem de linfócitos T-CD4+ inferior a 200 células/mm³), até que um grau satisfatório de reconstituição imune seja obtido com o uso de terapia antirretroviral, o que proporciona melhora na resposta vacinal e reduz o risco de complicações pós-vacinais. Deste modo, os indivíduos soropositivos para o HIV, podem receber todas as vacinas do calendário nacional, desde que não apresentem deficiência imunológica importante.

Apesar disso, um estudo recente realizado em São Paulo, por Ho e colaboradores (2008) descreveram que em relação ao tétano e a difteria a maioria dos pacientes soropositivos para HIV, apresentou imunização inadequada (30,6% tinham recebido esquema incompleto e 33,3% nunca tinham sido vacinados). Somente 36,1% dos indivíduos apresentaram imunização adequada.

No presente estudo, apenas 29% dos indivíduos soropositivos para HIV-1 foram considerados protegidos contra difteria. Não houve diferença significativa entre indivíduos soropositivos para HIV-1 militares e civis em relação a proporção de indivíduos com níveis de anticorpos protetores contra a difteria. Os pacientes militares HIV-1 positivos apresentaram níveis mais baixos de anticorpos IgG antitoxina diftérica (0,43 UI/mL) do que militares soronegativos (0,61 UI/mL), possivelmente devido aos motivos já explanados anteriormente, como os cuidados profiláticos com a saúde em fase anterior aos exercícios militares em campo, atividade em que o militar soropositivo, mesmo na ativa, não participa. No entanto, os civis do

grupo de HIV-1 positivos ou do grupo de doadores de sangue tinham níveis de anticorpos similares contra a difteria.

Comparando os níveis de anticorpos contra difteria em pacientes HIV -1 positivos com LT CD4+ > 350 células/mm³ ou ≤ 350 células/ mm³, não houve diferenças significativas entre civis ou militares (dados não mostrados). A média geométrica da concentração de IgG específica detectada entre indivíduos de diferentes grupos de CD4+ (≥ 500, ≥ 200 < 500 e < 200) variaram de 0,41 a 0,47 UI/mL (P>0,05). Os percentuais de indivíduos protegidos contra a difteria foram similares. Estes dados sugerem que o número de subpopulações de linfócito T pode não estar correlacionado significativamente com função dos linfócitos, conforme descrita anteriormente por Zaccarelli-Filho e colaboradores (2007).

O completo sucesso das vacinas (difteria e tétano) depende do desenvolvimento de células B de memória e da manutenção dos níveis de anticorpos protetores. Um dos mecanismos responsáveis pela memória sorológica é o desenvolvimento de plasmócitos de vida longa, residentes na medula óssea. Em algumas infecções virais ou vacinações, o início da produção de anticorpos após a re-exposição é dependente da presença de antígeno e mediado pela diferenciação das células B de memória dentro de células plasmática de curta duração. (Bonsignori *et al.* , 2009).

Todos os estudos citados na presente dissertação envolvendo os indivíduos infectados pelo HIV-1 (Pracanica *et al.*, 2002, Bonetti *et al.*, 2004, Ho *et al.*, 2008 e Tejiokem *et.al.*, 2009), relataram uma proporção significativa da população com níveis insatisfatórios de anticorpos protetores, indicando a necessidade de realização do reforço vacinal ou esquema de imunização completo seja em crianças ou adultos. Um dado inesperado do presente estudo foi a maior resposta de anticorpos antitoxina diftérica em pacientes não submetidos a tratamento com HAART em comparação com aqueles tratados. Como os anticorpos contra o tétano e a difteria tendem a diminuir com o tempo, a diferença de idade entre pacientes tratados com HAART (média de 46 anos) e os não tratados (média de 35 anos) podem ser parcialmente responsáveis por este achado. Além disso, os pacientes não tratados com HAART tinham menos tempo de conhecimento da infecção com HIV-1 (média de 4,1 anos) em comparação com os pacientes tratados com antirretrovirais (média de infecção com HIV-1 de 6,5 anos).

Pensierosco e colaboradores (2009) demonstraram que o início do tratamento com antirretrovirais no primeiro ano de vida de crianças soropositivas para HIV-1 permitiu o desenvolvimento normal e a manutenção das células B de memória, ao contrário, dos pacientes

tratados tardiamente, foi evidenciada a redução das funções das células B de memória e o comprometimento no controle da replicação viral. Destaca-se que ocorreu uma diminuição de anticorpos de proteção para vacinas com antígeno comum entre os tratados tardiamente com antirretrovirais com carga viral controlada e não controlada. O reforço vacinal após a reconstituição imune, quando o antirretroviral é utilizado, torna-se necessário para se obter uma resposta imune adequada. Com o aumento ao acesso a terapia com antirretrovirais pela população, principalmente na pediatria, a revacinação pode trazer grandes benefícios individuais e a comunidade, para a prevenção de doenças infecciosas (Farquhar et al., 2009).

Enfim, o conhecimento dos níveis de anticorpos protetores para microrganismos patogênicos em pacientes HIV-1, pode ser de grande valia para uma reavaliação dos calendários de vacinação utilizados neste grupo especial de pacientes. A vacinação eficaz em pacientes infectados pelo HIV-1 pode ser alcançada através de programas contínuos de educação em saúde associados às campanhas de vacinação.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões relativas aos níveis de anticorpos séricos IgG antitoxina diftérica nas subpopulações de indivíduos adultos atendidos no IBEx, Rio de Janeiro:

- Na população total estudada, aproximadamente 60% dos adultos apresentaram níveis insatisfatórios de proteção contra a difteria (IgG antitoxina diftérica $\geq 0,1 < 1,0$ UI/mL);
- Não foi observada correlação entre os níveis de IgG antitoxina diftérica e o sexo dos indivíduos;
- Dos 52% dos indivíduos que relataram ter recebido reforço da vacina dT na idade adulta, apenas 59%, cuja maioria era militar (72%), estavam protegidos contra a doença. Menos de 10% dos indivíduos soropositivos afirmaram que haviam sido imunizados contra a difteria nos últimos 10 anos;
- No grupo de soronegativos para o HIV-1 (doadores de sangue) foi observada uma maior proporção de indivíduos protegidos contra a doença, ao contrário do grupo de soropositivos, onde a maioria dos indivíduos estava parcialmente protegida;
- Na faixa etária de 18 – 30 anos, a maioria dos indivíduos soronegativos (civis e militares) estava completamente protegida enquanto o inverso foi notado para os indivíduos soropositivos;
- Para os civis soronegativos não foi observada correlação entre os níveis de IgG e a idade enquanto para os militares foi observada correlação inversa;
- Na faixa etária de 51 a 64 anos, foi observada a ausência de indivíduos soronegativos protegidos tanto no grupo de civis como no de militares;
- Entre os indivíduos soropositivos – ambas as categorias (civil e militar) apresentaram uma pequena proporção de indivíduos protegidos contra a doença;
- Não houve diferença significativa na resposta de anticorpos para difteria entre os indivíduos soropositivos com CD4 baixo ou normal;
- Os indivíduos soropositivos não tratados com antirretrovirais apresentaram menor tempo de infecção com HIV-1 em comparação com pacientes tratados com antirretrovirais. Uma maior proporção de pacientes protegidos contra a difteria foi observada no grupo dos pacientes não tratados com HAART;

- Apesar do esquema de vacinação recomendado atualmente para difteria, tétano e outras doenças imunopreveníveis apresentarem-se de elevado valor na prevenção destas doenças no grupo infantil, pouca atenção tem sido dada, nos países em desenvolvimento, quanto à imunidade dos adultos contra a difteria. A existência de adultos (militares e civis) suscetíveis, incluindo os indivíduos soropositivos, cria um potencial epidêmico em nossa comunidade e reforçam que estudos soropidemiológicos são imprescindíveis e devem ser rotineiramente mantidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alp Cavus S, Avkan Oguuz V, Yuce A. 2007. The prevalence of diphtheria among adults in Izmir- Turkey. *Vaccine*, 25 (19): 3851-3854.
- Anima H, Malay M, Santanu H, Rajashree R, Sita C, Baran SA. 2008. A study on determinants of occurrence of complications and fatality among diphtheria cases admitted to ID & BG Hospital of Kolkata. *J Commun Dis*, 40(1): 53-58.
- Aue A, Hennig H, Kruger S, Closius B, Kirchner H, Seyfarth M. 2003. Immunity against diphtheria and tetanus German blood donors. *Med Microbiol Immunol (Berlin)*, 192: 93-97.
- Ballereau F, Schirive I, Fisch A, Speich M, Laurichesse H, Tournade S. 1998. A multicentre serosurvey on diphtheria immunity in a French population of 1004 subjects. *Eur J Epidemiol*, 14(5): 499-503.
- Baseman JB, Pappenheimer AM Jr, Gill DM, Harper AA. 1970. Action of diphtheria toxin in the guinea pig. *J Exp Med*, 132: 1138-1152.
- Bayas JM, Vilella A, Bertran MJ, Vidal J, Batalla J, Asenjo MA, Salleras LL. 2001. Immunogenicity and reactogenicity of the adult tetanus-diphtheria vaccine. How many doses are necessary? *Epidemiol Infect*, 127: 451-460.
- Beavis KG, Weymouth LA. 1996. Cellular and molecular pathology of infectious diseases. Cellular and molecular pathogenesis. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, pp 219-244.
- Bjorkholm B, Bottiger M, Christenson B, Hagberg L. 1986. Antitoxin antibody levels and the outcome of illness during an outbreak of diphtheria among alcoholics. *Scand J Infect Dis*, 18: 235-239.
- Bodley JW. 1990. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 250: 832.
- Boletim Epidemiológico. 1999. Evolução Temporal das Doenças de Notificação Compulsória no Brasil de 1980 a 1998. Ministério da Saúde-Fundação Nacional de Saúde, Ano 111.

- Boletim Epidemiológico. 1999. Evolução Temporal das doenças de notificação Compulsória no Brasil de 1980-1998. Ano III. Edição Especial. Ministério da Saúde-Fundação Nacional de Saúde. 48p.
- Boletim Epidemiológico. 2007 – AIDS e DST – Jovens de 13 a 24 anos. Ano IV, Nº 1 - 27ª - 52ª – semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2006. Ano IV, Nº 1 - 01ª - 26ª - semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2007. Programa Nacional DST/AIDS. Brasília - DF.
- Boletim Epidemiológico. 2008 – AIDS e DST - Municípios com pelo menos um caso de AIDS em indivíduos com 50 anos ou mais. Ano V, Nº 1 - 27ª - 52ª – semanas epidemiológicas - julho a dezembro de 2007. Ano V, Nº 1 - 01ª - 26ª - semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2008. Programa Nacional DST/AIDS. Brasília - DF.
- Bonetti TCS, Succi RCM, Weckx LY, Tavares-Lopes L, Moraes MI. 2004. Tetanus and diphtheria antibodies and response to a booster dose in Brazilian HIV-1-infected women. *Vaccine*, 22:3707-3712.
- Bonsignori M, Moody MA, Parks RJ, Holl TM, Kelsoe G, Hicks CB, Vandergrift N, Tomaras GD, Haynes BF. 2009. HIV-1 Envelope Induces Memory B Cell Responses That Correlate with Plasma Antibody Levels after Envelope gp120 Protein Vaccination or HIV-1 Infection. *The Journal of Immunology*, 183, 2708 -2717.
- Boog CJ. 2009. Principles of vaccination and possible development strategies for rational design. *Immunology Letters*, 122(2):104-7.
- Boom R, Sol C J, Salimans M M, Jansen C L, Wertheim-van Dillen P M, Van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28(3): 495-503.
- Borkowsky W, Stiele C J, Grubmam S, Moore T, La Russa P, Krasinski K. 1987. Antibody response to bacterial toxoids in children infected with human immunodeficiency virus. *Clin Lab Obs*, 110: 563-566.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 597/GM, de 8 de abril de 2004. Institui, em todo território nacional, os calendários de vacinação. *Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]*, Brasília, 12 de abril de 2004. Seção 1. 69:46-47.

- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 5/SVS, de 21 de fevereiro de 2006. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos. Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil], Brasília, 22 de fevereiro de 2006. Seção 1. 34.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.602/GM, de 17 de Julho de 2006. Institui em todo o território nacional, os calendários de Vacinação da Criança, do Adolescente, do Adulto e do Idoso. Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil], Brasília, 18 de julho de 2006. Seção 1. 136:66.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. 2008. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV: 2008. Programa Nacional de DST e Aids. Série manuais nº 2 - 7a Edição. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2008. 244 p.
- Brennan M, Vitek C, Strebel P, Wattigney W, Bisgard K, Brisgalov S. 2000. How many doses of diphtheria toxoid are required for protection in adults? Results of a case-control study among 40- to 49-year-old adults in the Russian Federation. *J Infect Dis*, 181: S193-S196.
- cep.ensino.eb.br [homepage na internet]. Rio de Janeiro: Centro de Estudo do Pessoal do Exército, Exército Brasileiro; Ministério da Defesa [atualizada em 26 ago 2009; acesso em 08 set 2009]. Disponível em: <http://www.cep.ensino.eb.br/>
- Chang MP, Baldwin RL, Bruce C, Wisnieski BJ. 1989_a. Second cytotoxic pathway of diphtheria toxin suggested by nuclease activity. *Science*, 246: 1165-1167.
- Chang MP, Bramhall J, Graves S, Bonavida B, Wisnieski BJ. 1989_b. Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheria toxin-induced cytolysis: evidence that cell lysis is not a simple consequence of translation inhibition. *J Biol Chem*, 264: 15261-15267.
- Committee of Military Nutrition Research - CMNR, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. 1999. Military Strategies for Sustainment of Nutrition and Immune Function in the Field, National Academy Press, Washington. 708p.

- Compton, J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature (London)* 350:91–92.
- Cooper MA, Pommering TL, Korányi K. 2003. Primary immunodeficiencies. *Am Fam Physician*, 68: 2001-2008.
- Cohen D, Green MS, Katzenelson E, Slepion R, Bercovier H, Wiener M. 1994. Long-term persistence of anti-diphtheria toxin antibodies among adults in Israel. Implications for vaccine policy. *Eur J Epidemiol*, 10: 267-270.
- Cohen D, Katzenelson E, Green M, Slepion R, Bercovier H, Danon Y. 1991. Prevalence and correlates of diphtheria toxin antibodies among young adults in Israel. *J Infect*, 23(2): 117-121.
- Damasco PV, Pimenta FP, Filardy AA, Brito SM, Andrade AFB, Lopes GS, Hirata Jr R, Mattos-Guaraldi AL. 2005. Prevalence of IgG diphtheria antitoxin in blood donors in Rio de Janeiro. *Epidemiol Infect*, 133: 911-914.
- Danilova E, Shirayayev A, Kristoffersen EK, Sjørusen H. 2006. Seroprotection against diphtheria and tetanus among Russian and Norwegian. *APMIS*, 114 (6): 453-457.
- Dinelli MI, Fisberg M, de Moraes- Pinto MI. 2007. Tetanus and diphtheria immunity in adolescents from São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*, 40(2): 259-263.
- Dittmann S. 1997. Epidemie diphtheria in the Newly Independent States of the former USSR - Situation and lessons learned. *Biologicals*, 25: 179-186.
- Divino-Goes KG, de Moraes-Pinto MI, Dinelli MIS, Casagrande ST, Bonetti1 TCS, Andrade PR, L.Y. Weckx. 2007. Prevalence of diphtheria and tetanus antibodies and circulation of *Corynebacterium diphtheriae* in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*, 40:1681-1687.
- Dixon JMS. 1984. Diphtheria in North America. *J Hyg Camb*, 93: 419-432.
- D`Silva PR, Lala AK. 2000. Organization of diphtheria toxin in membranes. A hydrophobic photolabelin study. *J Biol Chem*; 275: 11771-11777
- Edmunds WJ, Pebody RG, Aggerback H, Baron S, Berbers G, Conyn-Van Sapendonck MAE, Hallander HO, Olandep R, Maple PAC, De Melker HE, Olin P, Fievet-Groynne F, Rota C, Salmaco S, Tischer A, Von-Huolstein C, Miller E. 2000. The seroepidemiology of diphtheria in Westem Europe. *Epidemiol Infect*, 125: 113-125.

- Farquhar C, Wamalwa D, Selig S, John-Stewart G, Mabuka J, Sutton W, Haigwood N, Wariua G, Lohman-Payne B. 2009. Immune Responses To Measles and Tetanus Vaccines among Kenyan Human Immunodeficiency Virus Type 1(HIV-1) – infected Children Pre- and Post- Highly Active Antiretroviral Therapy and Revaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 28:295-299.
- Formiga LCD, Mattos-Guaraldi AL. 1993. Diphtheria: current status and laboratory procedures for diagnosis. *Rev Bras Pat Clin*, 29: 93-96.
- Formiga LCD, Mattos-Guaraldi AL. 2001. Difteria – Profissionais susceptíveis, vacinação e reparação de danos. *J Bras Patol*, 37: 288-289.
- Funke G, Altwegg M, Frommelt L, von Graevenitz A. 1999. Emergence of related nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype *mitis* strains in Western Europe. *Emerg Infect Dis*, 5: 477-480.
- Funke G, Von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA. 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 10: 125-159.
- Galazka A. 2000. The changing epidemiology of diphtheria in the Vaccine Era. *J Infect Dis*, 181(suppl 1): S2-S9.
- Galazka Am.1993. The immunological basis for immunization series. Module 2: Diphtheria. *Bull. World Health Organization* p 13.
- Golaz A, Lance-Parker S, Welty T, Schaefer L, Volmer L, LaFromboise C. 2000. Epidemiology of diphtheria in South Dakota. *S D J Med*, 53: 281-285.
- Groman NB, Dean CK. 1973. Toxinogenicity in *Corynebacterium diphtheriae* after loss catalase, cystinase, or deoxyribonuclease activity. *Infect Immun*, 8: 442-445.
- Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinslering VA, Yakovlev AA. 2000. The pathology of diphtheria. *J Infect Dis*, 181(suppl 1): S116-S120.
- Hirata JR, Pereira GA, Filardy AD, Gomes DLR, Damasco PV, Rosa ACP, Nagao PE, Pimenta FP, Guaraldi ALM. 2008. Potential pathogenic role of aggregativeadhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, p. 986-991.
- Ho YL, Enohata T, Lopes MH, Sousa SS. 2008. Vaccination in Brazilian HIV-infected adults: a cross-sectional study. *AIDS Patient Care STDS*, 22(1): 65-70.

- ibex.eb.mil.br [homepage na internet]. Rio de Janeiro: Instituto de Biologia do Exército, Exército Brasileiro, Ministério da Defesa; [atualizada em 02 jun 2009; acesso em 13 jul 2009]. Disponível em: <http://www.ibex.eb.mil.br>.
- ipcfex.ensino.eb.br [homepage na internet]. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa e Capacitação Física do Exército, Exército Brasileiro, Ministério da Defesa; [atualizada em 24 abr 2009; acesso em: 13 jul 2009]. Disponível em: <http://www.ipcfex.ensino.eb.br>.
- Ipsen J. Circulating antitoxin at the onset of diphtheria in 425 patients. 1946. *J Immunol*, 54: 325.
- Instituto de Salud Carlos III. 2000. Estudio Seroepidemiológico: Situación de las enfermedades vacunables en España. Madrid.CNE. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Johnson VG. 1990. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 250: 832-834.
- Kadirova R, Kartoglu HU, Strebel PM. 2000. Clinical characteristics and management of 676 hospitalized diphtheria cases, Kyrgyz Republic, 1995. *J Infect Dis*, 181: S110-S115.
- Kievits, T., B. Van Gemen, D. Van Strijp, R. Schukkink, M. Dircks, H. Adriaanse, L. Malek, R. Sooknanan, and P. Lens. 1991. NASBA TM isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J. Virol. Methods*, 35:273–286.
- Kristiansen M, Aggerbeck H, Heron I. 1997. Improved ELISA for determination of anti-diphtheria and/or anti-tetanus antitoxin antibodies in sera. *APMIS*, 105: 843-853.
- Kroon FP, van Dissel JT, Labadie J, van Loon AM, van Furth R. 1995. Antibody response to diphtheria, tetanus, and poliomyelitis vaccines in relation to the number of CD4+ T lymphocytes in adults infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 21: 1197-203.
- Lange CG, Lederman MM, Medvik K, Asaad R, Wild M, Kalayjian R, et al. 2003. Nadir CD4+ T-cell count and numbers of CD28+ CD4+ T-cells predict functional responses to immunizations in chronic HIV-1 infection. *AIDS*, 17: 2015-2023.
- Lizuka H, Furuta JA, Oliveira EP. 1980. Diphtheria immune status of an urban infant population of São Paulo, SP, Brazil. *Rev Saúde Pública*, 14: 462-468.

- Macambira RP, Formiga LB, Formiga LCD. 1994. Difteria: o grave prognóstico brasileiro. *JBM*, 66: 69-81.
- Machado TL. 1989. Avaliação dos testes de toxigenicidade na comprovação da real atoxinogenicidade de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos clínicos e portadores. Tese de Mestrado, Instituto de Microbiologia, UFRJ.
- Marlovits S, Stocker R, Efstratiou A, Broughton K, Kaider A, Vecsei V, Wiedermann G, Kollaritsch H. 2000. Seroprevalence of diphtheria immunity among injured adults in Austria. *Vaccine*, 19: 1061-1067.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. 1998. Bacteriological properties of a sucrose fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Curr Microbiol*, 37: 156-158.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA, Pereira GA, Moreira LO, Pimenta FP, Camello TCF, Oliveira EF. 2001_a. Diphtheria in a vaccinated adult in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol*, 32: 236-239.
- Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Camello TCF, Pereira GA, Hirata Jr R, Dias LMD, Halpern M. 2001_b. *Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients. *Rev Argentina Microbiol*, 33: 96-100.
- McQuillan GM, Kruszon-Moran D, Deforest A, Chu SY, Wharton M. 2002. Serologic immunity to diphtheria and tetanus in the United States. *Ann Intern Med*. 136: 660-666.
- Melville-Smith M, Balfour A. 1988. Estimation of *Corynebacterium diphtheriae* anti toxin in human sera: a comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with the toxin neutralisation test. *J Med Microbiol*, 25: 279-283.
- Mekada E, Okada Y, Uchida T. 1988. Identification of diphtheria toxin receptor and a nonproteinous diphtheria toxin-binding molecule in Vero cell membrane. *J Cell Biol*, 107: 511-519.
- Nakamura LT, Wisniewski BJ. 1990. Characterization of the deoxyribonuclease activity of diphtheria toxin. *J Biol Chem*, 265: 5237-5241.
- Ohuabunwo C, Perevoscikovs J, Griskevica A, Gargiullo P, Brilla A, Viksna L. 2005. Respiratory diphtheria among highly vaccinated military trainees in Latvia: improved

- protection from DT compared with Td booster vaccination. *Scand J Infect Dis*, 37: 813-820.
- Ölander R M, Auranen K, Härkänen, Leino T. 2009. High tetanus and diphtheria antitoxin concentrations in Finnish adults – Time for new booster recommendations? *Vaccine*, 27(39):5295-8.
- Pappenheimer A M Jr. 1977. Diphtheria toxin. *Ann Rev Biochem*, 46: 69-94.
- Pappenheimer A M Jr. 1993. The story of a toxic protein, 1888-1992. *Protein Sci*, 2: 292-298.
- Patey O, Bimet F, Riegel P, Halioua B, Emond JP, Estrangin E, Dellion S, Alonso JM, Kiredjian M, Dublanchet A, Lafaix C, 1997. The Coryne Study Group. Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. *J Clin Microbiol*, 35: 441-445.
- Pensiero S, Cagigi A, Palma P, Nilsson A, Capponi C, Freda E, Bernardi S, Thorstensson R, Chiodi F, Rossi P. 2009. Timing of HAART defines the integrity of memory B cells and the longevity of humoral responses in HIV-1 vertically-infected children. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (19):7939-44.
- Pereira GA. 2001. Aspectos fenotípicos e genotípicos de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas no Brasil. Tese de Mestrado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- Pimenta FP, Damasco PV, Cerbino Neto J, Lopes G S, Hirata R Jr, Milagres LG. 2006. Diphtheria-neutralizing antibody levels in healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101: 459-462.
- Portal da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmissíveis, Gráficos de evolução de doenças (1980-2005). 2009_a Disponível em: http://www.saude.gov.br/vigilancia_epidemiologica_de_doencas_transmissiveis. Acesso em: 03 fev.2009.
- Portal da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Profissional ou Gestor, Difteria, aspectos epidemiológicos. 2009_b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizartexto.cfm?idtxt=31713>. Acesso em: 05 ago.2009.
- Pracanica A, Russo P, Zaccarelli-Filho CA, Succi R, Santos A, Weck L, Moraes-Pinto MI. 2002. Response to primary immunization to tetanus, diphtheria, *Haemophilus*

- influenza* type b and measles in HIV infected children on HAART. Ninth conference on retroviruses and opportunistic infections, Seattle, EUA. Feb 24-28.
- Rakhmanova AG, Prigozhina VK, Nosikova EV, Kadirova SN, Stepanova EV, Taitis BM. 1996. Fatal diphtheria outcomes in vaccinated adults. *Klin Med. (Mosk)*, 74: 67-69.
- Salyers AA, Whitt DD. 1994. Diphtheria. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. American Society for Microbiology, Washington, pp 113-121.
- Schneerson R, Robbins JB, Taranger J, Lagergard T, Trollfors B. 1996. A toxoid vaccine for pertussis as well as diphtheria? Lessons to be relearned. *Lancet*, 348: 1289-1292.
- Schwanig M. 1997. Migration: public health issues (polio, hepatitis A, hepatitis B, tuberculosis, diphtheria). *Biologicals*, 25:187-193.
- Simonsen O. 1989. Vaccination against tetanus and diphtheria. *Dan Med Bull*, 36: 24-47.
- Stanley SK, Osrowski MA, Justement JS, Gantl K, Hedyati S, Mannix M, Roche K, Schewrtzentruber DJ, Fox CH, Fauci AS. 1996. Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *New England J Med*, 334: 1222-1223.
- Strauss, K., I. Hannet, S. Engels, et al. 1996. Performance evaluation of the FACSCount system: a dedicated system for clinical cellular analysis. *Cytometry* 26:52-59.
- Tejiokem MC, Njamkepo E, Gouandjika I, Rousset D, Beniguel L, Bilong C, Tene G, Penda I, Ngongueu C, Gody JC, Guiso N, Baril L. 2009. Whole-cell pertussis vaccine induces low antibody responses in HIV-infected children living in sub-Saharan Africa. *Clin Vaccine Immunol*, 16(4):479-83.
- UNAIDS/WHO Global HIV/AIDS. 2008. Epidemiological Fact Sheets on HIV and AIDS, 2008 Update. Disponível em:
http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/EFS2008/full/EFS2008_BR.pdf.
 Acesso em: 22 maio 2009.
- van Gemen, B., T. Kievits, R. Schukink, D. Van Strijp, L. T. Malek, R. Sooknanan, H. G. Huisman, and P. Lens. 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBATM during a HIV-1 primary infection. *J. Virol. Methods*, 43:177-188.
- Valdez H, Smith KY, Landy A, Connick E, Kuritzkes DR, Kessler H, Fox L, Spritzler J, Roe J, Lederman MB, Lenderman HM, Evans TG, Heath-Chiozzi M, Lederman MM, ACTG 375 team. 2000. Response to immunization with recall and neoantigens after

- prolonged administration of an HIV-1 protease inhibitor-containing regimen. *AIDS*, 14: 11-21.
- Volzke H, Kloker KM, Kramer A, Guertler L, Dören M, Baumeister SE. 2006. Susceptibility to diphtheria in adults: prevalence and relationship to gender and social variables. *Clin Microbiol Infect*, 12: 961-967.
- Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y. 1978. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell*, 15: 245-250.
- Youwang Y, Jianming D, Yong X, Pong Z. 1992. Epidemiologic features of an outbreak of diphtheria and its control with diphtheria toxoid immunization. *Inter J Epidemiol*, 21: 807-811.
- Weckx L.Y., Divino-Goes K., Lihama D.M., Carraro E., Bellei N., Granato C.F.H., de Moraes-Pinto M.I. 2006. Effect of a single tetanus-diphtheria vaccine dose on the immunity of elderly people in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39: 519-523.
- Wilson BA, Blanke SR, Murphy JR, Pappenheimer AM Jr, Collier RJ. 1990. Does diphtheria toxin have nuclease activity? *Science*, 250: 834-835.
- World Health Organization (WHO). 2009. Programmers and projects, Immunization surveillance, assessment and monitoring, Vaccine-preventable diseases. Disponível em: http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/diphtheria/en/index.html. Acesso em: 02 jun 2009
- World Health Organization (WHO)/ United Nations Children's Fund (UNICEF). 2009. Review of National Immunization Coverage Brazil 1980-2008. Disponível em: http://www.who.int/immunization_monitoring/data/bra.pdf. Acesso em: 02 jun 2009
- Zaccarelli-Filho CA, Ono E, Machado DM, Brunialti M, Succi RC, Salomão R, Kallás EG, Moraes-Pinto L. 2007. HIV-1-infected children on HAART: immunologic features of three different levels of viral suppression. *Cytometry B Clin Cytom*. 72:14-21.
- Zuber PLF, Gruner E, Altwegg M, von Graevenitz A. 1992. Invasive infection with non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* among drug users. *Lancet*, 339: 1359.

ANEXO A - Calendários de vacinação (Portaria N° 1.602/GM - 17 Jul 2006)

CALENDÁRIO DE VACINAÇÃO DA CRIANÇA			
IDADE	VACINA	DOSE	DOENÇAS EVITADAS
Ao nascer	BCG-ID	Dose única	Formas graves da Tuberculose
	Contra Hepatite B ⁽¹⁾	1ª dose	Hepatite B
1 mês	Contra Hepatite B	2ª dose	Hepatite B
2 meses	Tetavalente (DTP + Hib) ⁽²⁾	1ª dose	Difteria, Tétano, Coqueluche, Meningite e outras infecções por Haemophilus influenzae tipo b
	VOP (Vacina Oral contra a Poliomielite)	1ª dose	Poliomielite ou Paralisia Infantil
	VORH (Vacina Oral de Rotavírus Humano) ⁽³⁾	1ª dose	Diarréia por Rotavírus
4 meses	Tetavalente (DTP + Hib)	2ª dose	Difteria, Tétano, Coqueluche, Meningite e outras infecções por Haemophilus influenzae tipo b
	VOP (Vacina Oral contra a Poliomielite)	2ª dose	Poliomielite ou Paralisia Infantil
	VORH (Vacina Oral de Rotavírus Humano) ⁽⁴⁾	2ª dose	Diarréia por Rotavírus
6 meses	Tetavalente (DTP + Hib)	3ª dose	Difteria, Tétano, Coqueluche, Meningite e outras infecções por Haemophilus influenzae tipo b
	VOP (Vacina Oral contra a Poliomielite)	3ª dose	Poliomielite ou Paralisia Infantil
	Contra Hepatite B	3ª dose	Hepatite B
9 meses	Contra Febre Amarela ⁽⁵⁾	Dose inicial	Febre Amarela
12 meses	SCR (Tríplice Viral)	Dose única	Sarampo, Caxumba e Rubéola
15 meses	DTP (Tríplice Bacteriana)	1º reforço	Difteria, Tétano, Coqueluche
	VOP (Vacina Oral contra a Poliomielite)	Reforço	Poliomielite ou Paralisia Infantil
4 - 6 anos	DTP (Tríplice Bacteriana)	2º reforço	Difteria, Tétano, Coqueluche
	SCR (Tríplice Viral)	Reforço	Sarampo, Caxumba e Rubéola
10 anos	Contra Febre Amarela	Reforço	Febre Amarela

(1) A primeira dose da vacina contra Hepatite B deve ser administrada na maternidade, nas primeiras 12 horas de vida do recém-nascido. O esquema básico se constitui de 3 (três) doses, com intervalos de 30 dias da primeira para a segunda dose e 180 dias da primeira para a terceira dose.

- (2) O esquema de vacinação atual é feito aos 2, 4 e 6 meses de idade com a vacina Tetravalente e dois reforços com a Tríplice Bacteriana (DTP). O primeiro reforço aos 15 meses e o segundo, entre 4 e 6 anos.
- (3) É possível administrar a primeira dose da Vacina Oral de Rotavírus Humano a partir de 1 mês e 15 dias a 3 meses e 7 dias de idade (6 a 14 semanas de vida).
- (4) É possível administrar a segunda dose da Vacina Oral de Rotavírus Humano a partir de 3 meses e 7 dias a 5 meses e 15 dias de idade (14 a 24 semanas de vida). O intervalo mínimo preconizado entre a primeira e segunda dose é de 4 semanas.
- (5) A vacina contra Febre Amarela está indicada para crianças a partir dos 9 meses de idade, que residam ou que irão viajar para área endêmica (estados: AP, TO, MA, MT, MS, RO, AC, RR, AM, PA, GO e DF), área de transição (alguns municípios dos estados: PI, BA, MG, SP, PR, SC e RS) e área de risco potencial (alguns municípios dos estados: BA, ES e MG). Se viajar para áreas de risco, vacinar contra Febre Amarela 10 (dez) dias antes da viagem.

CALENDÁRIO DE VACINAÇÃO DO ADOLESCENTE ⁽¹⁾

IDADE e INTERVALO ENTRE AS DOSES	VACINA	DOSE	DOENÇAS EVITADAS
De 11 a 19 anos (na primeira visita ao serviço de saúde)	Contra Hepatite B	1ª dose	Hepatite B
	dT (Dupla tipo adulto) ⁽²⁾	1ª dose	Difteria e Tétano
	Contra Febre Amarela ⁽³⁾	Reforço	Febre Amarela
	SCR (Tríplice Viral) ⁽⁴⁾	Dose única	Sarampo, Caxumba e Rubéola
1 mês após a 1ª dose contra Hepatite B	Contra Hepatite B	2ª dose	Hepatite B
6 meses após a 1ª dose contra Hepatite B	Contra Hepatite B	3ª dose	Hepatite B
2 meses após a 1ª dose contra Difteria e Tétano	dT (Dupla tipo adulto)	2ª dose	Difteria e Tétano
4 meses após a 1ª dose contra Difteria e Tétano	dT (Dupla tipo adulto)	3ª dose	Difteria e Tétano
A cada 10 anos por toda vida	DT (Dupla tipo adulto) ⁽⁵⁾	Reforço	Difteria e Tétano
	Contra Febre Amarela	Reforço	Febre Amarela

- (1) Adolescente que não tiver comprovação de vacinação anterior, seguir este esquema. Se apresentar documentação com esquema incompleto, completar o esquema já iniciado.
- (2) Adolescente que já recebeu anteriormente 3 (três) doses ou mais das vacinas DTP, DT ou dT, aplicar uma dose de reforço. É necessário doses de reforço da vacina a cada 10 anos. Em caso de ferimentos graves ou gravidez, antecipar a dose de reforço para 5 (cinco) anos após a última dose. O intervalo mínimo entre as doses é de 30 (trinta) dias.
- (3) Adolescente que resida ou que irá viajar para área endêmica (estados: AP, TO, MA, MT, MS, RO, AC, RR, AM, PA, GO e DF), área de transição (alguns municípios dos estados PI, BA, MG, SP, PR, SC E RS) e área de risco potencial (alguns municípios dos estados BA, ES e MG). Em viagem para essas áreas, vacinar 10 (dez) dias antes da viagem.
- (4) Adolescente que tiver duas doses da vacina Tríplice Viral (SCR) devidamente comprovada no cartão de vacinação, não precisa receber esta dose.

Adolescente grávida, que esteja com a vacina em dia, mas recebeu sua última dose há mais de 5 (cinco) anos, precisa receber uma dose de reforço, a dose deve ser aplicada no mínimo

- (5) 20 dias antes da data provável do parto. Em caso de ferimentos graves, a dose de reforço deve ser antecipada para cinco anos após a última dose.

CALENDÁRIO DE VACINAÇÃO DO ADULTO E IDOSO

IDADE	VACINAS	DOSE	DOENÇAS EVITADAS
A partir de 20 anos	dT (Dupla tipo adulto) ⁽¹⁾	1ª dose	Contra Difteria e Tétano
	Contra Febre Amarela ⁽²⁾	Dose inicial	Contra Febre Amarela
	SCR (Tríplice Viral) ⁽³⁾	Dose única	Sarampo, Caxumba e Rubéola
2 meses após a 1ª dose contra Difteria e Tétano	dT (Dupla tipo adulto)	2ª dose	Contra Difteria e Tétano
A cada 10 anos por toda vida	dT (Dupla tipo adulto) ⁽⁴⁾	Reforço	Contra Difteria e Tétano
	Contra Febre Amarela	Reforço	Contra Febre Amarela
60 anos ou mais	Influenza ⁽⁵⁾	Dose anual	Contra Influenza ou Gripe
	Pneumococo ⁽⁶⁾	Dose única	Contra Pneumonia causada pelo pneumococo

- (1) A partir dos 20 (vinte) anos de idade gestantes, não gestantes, homens e idosos que não tiverem comprovação de vacinação anterior, seguir o esquema acima. Apresentando documentação com esquema incompleto, completar o esquema já iniciado. O intervalo mínimo entre as doses é de 30 (trinta) dias.
- (2) Adulto/Idoso que resida ou que irá viajar para área endêmica (estados: AP, TO, MA, MT, MS, RO, AC, RR, AM, PA, GO e DF), área de transição (alguns municípios dos estados: PI, BA, MG, SP, PR, SC E RS) e área de risco potencial (alguns municípios dos estados BA, ES e MG). Em viagem para essas áreas, vacinar 10 (dez) dias antes da viagem.
- (3) A vacina tríplice viral - SCR (Sarampo, Caxumba e Rubéola) deve ser administrada em mulheres de 12 a 49 anos de idade que não tiverem comprovação de vacinação anterior e em homens até 39 (trinta e nove) anos de idade.
- (4) Mulher grávida, que esteja com a vacina em dia, mas recebeu sua última dose há mais de 5 (cinco) anos, precisa receber uma dose de reforço, a dose deve ser aplicada no mínimo 20 dias antes da data provável do parto. Em caso de ferimentos graves, a dose de reforço deverá ser antecipada para cinco anos após a última dose.
- (5) A vacina contra Influenza é oferecida anualmente durante a Campanha Nacional de Vacinação do Idoso.
- (6) A vacina contra pneumococo é aplicada, durante a Campanha Nacional de Vacinação do Idoso, nos indivíduos que convivem em instituições fechadas, tais como, casas geriátricas, hospitais, asilos, casas de repouso, com apenas um reforço cinco anos após a dose inicial.

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

82

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 30 de outubro de 2006

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
 Prof.: Wille Oigman
 Para: Prof^a. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1548-CEP/HUPE) "PESQUISA DE ANTICORPOS ANTIDIFTÉRICOS E ANTITETÂNICOS E RESPOSTA AO REFORÇO VACINAL EM INDIVÍDUOS SADIOS E IMUNOCOMPROMETIDOS" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


 Prof. Wille Oigman
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO. 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Projeto de Pesquisa: “Pesquisa de anticorpos IgG antitoxina diftérica e fenotipagem de linfócitos T em indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV-1 acompanhados no Instituto de Biologia do Exército – Rio de Janeiro”.

Responsável pelo projeto:

FRANCISCO ALMEIDA BRAGA SPERANZA, TEL.: 3890-2135 R- 212

Farmacêutico responsável pela Seção de Virologia do Instituto de Biologia do Exército (IBEx)

Serviços participantes:

Seção de Banco de Sangue do Instituto de Biologia do Exército (IBEx)

Clínica de Doenças Infecto-Parasitárias- Hospital Central do Exército (HCE)

Nome do voluntário (a): _____

O (a) Sr.(a) está sendo convidado a participar, como voluntário, de uma investigação científica conduzida pelo IBEx, com objetivo de avaliar a presença e a quantidade de anticorpos antitoxina diftérica, os quais conferem proteção ou imunidade a doença chamada difteria. Trata-se de uma doença grave, mas que pode ser prevenida através de vacinação.

Dois grupos de adultos serão estudados, um com portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) e um com doadores de sangue sadios e não portadores deste vírus.

Estudos recentes sugerem diferenças de imunidade para difteria nestes grupos, nosso projeto pretende verificar e analisar a imunidade das populações de ambos os grupos, e caso haja necessidade oferecer a vacina e acompanhar a resposta à mesma.

Este documento procura fornecer ao (a) Sr. (a) as informações necessárias sobre todos procedimentos a serem adotados, bem como os exames, os benefícios.

O (a) Sr. (a) poderá recusar-se a participar da pesquisa ou, mesmo dela afastar-se em qualquer tempo sem que este fato lhe venha causar constrangimento, penalidade por parte da instituição, interrupção de seu tratamento ou realização de exames laboratoriais.

Os pesquisadores obrigam-se a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, assim como poderão interromper a participação do (a) Sr. (a), a qualquer tempo, por razões médicas quando, então, serão fornecidos aconselhamentos e orientações.

Todos os custos desta pesquisa correrão por conta da Instituição.

Quando tivermos analisado os resultados desta pesquisa, eles serão apresentados a todos interessados.

Antes de assinar este termo, o (a) Sr.(a) deve informar-se plenamente não hesitando em formular perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

1- Objetivo da investigação: Avaliar a presença de anticorpos no sangue que conferem proteção contra a difteria.

2- Procedimentos que serão realizados: Neste estudo serão realizadas coletas de amostra de sangue de cerca de 10 ml, por punção venosa, que deverá ser autorizada pelo Sr. (a). no ato da assinatura deste termo. Caso o(a) Sr.(a) pertença ao grupo dos infectados pelo HIV, ao aceitar em ser voluntário deste projeto de pesquisa, estará autorizando o uso da alíquota de seu sangue coletado para realizar os exames de carga viral para HIV e Contagem de linfócitos T CD4+/CD8+ na seção de virologia.

3- Benefícios: O (a) Sr.(a) terá o resultado da análise de seu sangue, correspondentes a proteção ou não contra a difteria. Caso os seus níveis de anticorpos não estejam lhe conferido proteção contra difteria (níveis de proteção ≥ 1 UI/ mL), o médico da equipe fará contato e marcará uma avaliação, reunidas as condições para vacinação o(a) Sr.(a) será encaminhado ao posto de vacinação do IBEx.

4- Os voluntários que receberão as vacinas serão convocados a retornarem após trinta dias para coleta de uma nova amostra de sangue para reavaliação da quantidade de anticorpos circulantes, ou seja, a verificação da proteção contra difteria.

5- Riscos potenciais:

- Coleta de sangue: os riscos para o participante são mínimos, apenas os decorrentes da retirada de sangue por punção venosa, tais como o aparecimento de manchas arroxeadas no braço.
- Vacinação: eventos adversos mais comuns são: dor, calor, vermelhidão e endureção local. Não podemos deixar de ressaltar as contra – indicações: 1) reação anafilática sistêmica grave decorrente de aplicação de dose anterior; 2) síndrome de Guillain-Barré nas seis semanas após a vacinação contra difteria

6- Preenchimento de uma Ficha Individual de Investigação

Declaro estar ciente do inteiro teor deste **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, decidindo-me a participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer tempo. Declaro, pois, dar meu consentimento para participar desta investigação estando ciente ainda de que esta cópia permanecerá arquivada no IBEx.

Caso tenha alguma dúvida ou necessidade de esclarecimento sobre o estudo você pode entrar em contato, a qualquer momento, com os pesquisadores envolvidos.

Assinatura: _____

RG: _____ Data: _____

APÊNDICE B - Fichas de dados clínicos e laboratoriais

PROJETO: “Pesquisa de anticorpos IgG antitoxina diftérica e fenotipagem de linfócitos T em indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV-1 acompanhados no Instituto de Biologia do Exército – Rio de Janeiro”.

FICHA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

GRUPO HIV

IDENTIFICAÇÃO:

Nome : _____

Data de nascimento: ___/___/___ **Idade(anos):** _____ **Sexo:** Masc Fem

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Telefones: _____

Ocupação: _____

Categoria: Militar da Ativa Militar Inativo Dependente Pensionista
 Servidor Civil Civil

Unidade de tratamento: Militar Civil Instituição: _____

CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA: _____

ÚLTIMOS EXAMES:

- Data: _____ Carga viral: _____ cópias/ mL Log: _____
- Data: _____ CD4: _____ células/ mm³ CD8: _____ células/ mm³ Rel. CD4/CD8: _____
CD3: _____ células/ mm³

MEDICAÇÃO ATUAL:

Antiretrovirais utilizados no último tratamento

Não Utiliza

Utiliza início: ___/___/___ Esquema: _____

Utilização de outros medicamentos;

Não

Sim quais: _____

EM RELAÇÃO A PESQUISA PERGUNTA-SE:

Você foi vacinado na infância? Sim Não Ignorado

Você tem seu cartão de vacina? Sim Não Ignorado

Você foi vacinado para o tétano e difteria nas campanhas de vacinação?

Sim Não Ignorado

PROJETO: “**Pesquisa de anticorpos IgG antitoxina diftérica e fenotipagem de linfócitos T em indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV-1 acompanhados no Instituto de Biologia do Exército – Rio de Janeiro**”.

FICHA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

GRUPO DOADORES DE SANGUE

IDENTIFICAÇÃO:

Nome : _____

Data de nascimento: ___/___/___ **Idade(anos):** _____ **Sexo:** Masc Fem

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Telefones: _____

Ocupação: _____

Categoria: Militar da Ativa Militar Inativo Dependente Pensionista
 Servidor Civil Civil

QUANTO A DOAÇÃO DE SANGUE: primeira vez doa com frequência

Utilização medicamentos:

Não

Sim, quais: _____

EM RELAÇÃO A PESQUISA PERGUNTA-SE:

Você foi vacinado na infância? Sim Não Ignorado

Você tem seu cartão de vacina? Sim Não Ignorado

Você foi vacinado para o tétano e difteria nas campanhas de vacinação?

Sim Não Ignorado

Qual foi o último ano em que você foi vacinado para o tétano e difteria? []

Você passou pelo serviço militar? Sim Não

Durante o serviço militar você foi vacinado? * Sim Não Ignorado

* Caso a resposta seja sim, especifique a vacina que tomou: _____

No momento você apresenta algum tipo de lesão na pele? * Sim Não

* Caso a resposta seja sim, mostre ou explique como é a lesão: _____

RESULTADOS:

- Pesquisa de anticorpos anti-HIV (ELISA): _____
- Contagem de Linfócitos T:
 CD4: _____ células/ mm³ CD8: _____ células/ mm³ Rel. CD4/CD8: _____
 CD3: _____ células/ mm³
- Pesquisa de anticorpos antitoxina diftérico:
 _____ UI/mL

CONCLUSÃO:

- Voluntário **APRESENTA** níveis de anticorpos de **PROTEÇÃO CONTRA DIFTERIA.**
- Voluntário **NÃO APRESENTA** níveis de anticorpos de **PROTEÇÃO CONTRA DIFTERIA.**

O VOLUNTÁRIO QUE NÃO POSSUIR PROTEÇÃO CONTRA DIFTERIA, SERÁ ACONSELHADO A TOMAR UMA DOSE DE REFORÇO OU REFAZER TODO ESQUEMA DE VACINAÇÃO, CONFORME A QUANTIDADE DE ANTICORPOS DOSADOS.

AValiação CLÍNICA:

- o voluntário **REUNE CONDIÇÕES** clínicas e laboratoriais para **SER VACINADO.**
- o voluntário **NÃO REUNE CONDIÇÕES** clínicas e laboratoriais para **SER VACINADO.**

Data: / / _____

Médico avaliador

VACINAÇÃO:

Data: / / Lote: Vacina:

Coleta de nova amostra de sangue: / / (após 30 dias da vacinação)

Resultado da pesquisa de anticorpos antitoxina diftérico, após reforço vacinal:

_____ UI/mL

CONCLUSÃO FINAL:

- Voluntário **APRESENTA** níveis de anticorpos de **PROTEÇÃO CONTRA DIFTERIA.**
- Voluntário **NÃO APRESENTA** níveis de anticorpos de **PROTEÇÃO CONTRA DIFTERIA.**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)